

Incompatibilität und Replikation des Resistenzplasmids RP4

von
Reinhard Simon
aus Steinwiesen

1980 #369

Incompatibilität und Replikation des Resistenzplasmids RP4

Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen - Nürnberg
zur
Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von
Reinhard Simon
aus Steinwiesen

Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaft-
lichen Fakultäten der Universität Erlangen-Nürnberg



Tag der mündlichen Prüfung: 14.7.1980

Vorsitzender der Promotionskommission:

Professor Dr. H. Wegener

Erstberichterstatter : Professor Dr. A. Pühler

Zweitberichterstatter : Professor Dr. W. Heumann

I n h a l t

A	ZUSAMMENFASSUNG	6
B	EINLEITUNG	7
C	<u>MATERIAL und METHODEN</u>	12
I.	<u>Medien, Zusätze, Puffer, Enzyme und Chemikalien</u>	12
1.	Nährmedien	12
2.	Zusätze zu Nährmedien	12
3.	Puffer	13
4.	Enzyme und Chemikalien	13
II.	<u>Bakterienstämme, Plasmide und Phagen</u>	14
1.	Bakterienstämme	14
2.	Plasmide	15
3.	Phagenstämme	15
III.	<u>Methoden</u>	16
1.	Bakterienanzucht und Kreuzungsmethoden	16
2.	Phasenkontrastmikroskopie	18
3.	Phagentechnologie	18
3.1.	Phagenlysatzgewinnung	18
3.2.	P1-Transduktion	18
3.3.	Mu _C + Insertionsmutagenese	19
4.	Plasmid-DNA Isolierung und Charakterisierung	19
4.1.	Plasmid-Kopienzahl-Bestimmung	19
4.2.	Plasmidnachweis im Agarosegel	20
4.3.	Plasmid-DNA Isolierung	22
4.4.	Sucrosegradientenzentrifugation	24
4.5.	Restriktionsanalyse	24
4.6.	Heteroduplexanalysen	25
D	<u>ERGEBNISSE</u>	28
I.	<u>Wechselwirkungen zwischen RP4-Derivaten</u>	28
1.	Vorbemerkungen	28
1.1.	Kurze Darstellung des Grundkonzepts der Arbeit	28
1.2.	Das Plasmidsystem	30
2.	Wechselwirkungen von RP4-2 mit pSR100 und pSR120 nach Konjugation	33
2.1.	Vergleich von recA ⁺ und recA ⁻ Rezipienten	33

2.2.	Verhalten der Plasmide nach Coselektion	37
3.	Incompatibilität zwischen RP4-Derivaten	40
3.1.	Plasmidauswahl	40
3.2.	Methodik der Incompatibilitätsuntersuchungen	42
3.3.	Transduktionstest A: Wechselwirkungen zwischen RP4-Mutanten untereinander und mit pSR100 als Rezipienten-Plasmid	45
	A-1 : RP4-Mutanten als Rezipienten-Plasmide	45
	A-2 : pSR100 als Rezipienten-Plasmid	47
3.4.	Transduktionstest B : Sonderstellung von pSR120	47
3.5.	Transduktionstest C : Verhalten von pSR100 nach Transduktion zu RP4-2-Tc::Mu	51
3.6.	Untersuchungen zur Zellmorphologie	57
4.	Zusammenfassung der Ergebnisse	60
II.	<u>Konstruktion von Replikations-defekten RP4-2 Mutanten</u>	63
1.	Erläuterung des Versuchsschemas der Mu-Mutagenese	63
2.	Ergebnisse der Mu-Mutagenese	67
3.	Nachtest auf RP4-2-Rep::Mu Mutanten	73
3.1.	Experimentelle Einzelheiten des Nachtests	73
3.2.	Nachtest zufällig ausgewählter Einzelkolonien	77
3.3.	Zusammenfassung bisheriger Ergebnisse und Erweiterung des Versuchskonzepts	80
3.4.	Nachtest von Mikrokolonien der Primärselektion	83
3.5.	Nachtest von großen Einzelkolonien der Primärselektion auf RP4-2::Mu und von Kontrollstämmen	88
4.	Zusammenfassung der Ergebnisse der Mu-Mutagenese	93
III.	<u>Genetische Charakterisierung von RP4-2-Rep::Mu Mutanten</u>	97
1.	Plasmidlängenklassen	97
2.	Stabilität von RP4-2-Rep::Mu Mutanten	99
3.	Kreuzungsexperimente mit RP4-2-Rep::Mu Mutanten	111
4.	Transconjugantenanalysen der Kreuzungen mit Rep-Donoren	117
	A : Kreuzungen mit Rep-1 Donoren	117
	B : Kreuzungen mit Rep-3 Donoren	120
	C : Kreuzungen mit Rep-8 Donoren	122
5.	Wachstumseigenschaften von Stämmen mit Rep-Plasmiden	126

IV.	<u>Kartierung von Transcomplementations- abhängigen RP4 Genen</u>	131
1.	Sma-Kartierung von Rep-Mutanten	131
2.	Heteroduplexexperimente zur Kartierung von RP4-2-Rep::Mu	135
E	<u>DISKUSSION</u>	143
I.	<u>Plasmidincompatibilität</u>	143
1.	Vorbemerkungen	143
2.	Literaturübersicht	144
2.1.	Theoretische Überlegungen zur Incompatibilität	144
	A : Replikon Modell	144
	B : Inhibitor Modell	144
	C : Verteilungsmodell	145
2.2.	Experimentelle Aspekte von Incompatibilitätsanalysen	146
3.	Plasmide und Methodik der RP4-Incompatibilitätstests	148
4.	RP4-Verdrängungsreaktionen	150
5.	Modellvorstellungen zum RP4-Incompatibilitätsmechanismus	151
6.	Experimentelle Fragestellungen auf der Basis des Replikon Modells	153
7.	Asymmetrische Incompatibilität zwischen miniRP4 und RP4	156
II.	<u>Konstruktion und Identifizierung von Replikations- defekten RP4-Mutanten</u>	163
1.	Die Vorteile der Mu-Mutagenese Technik	163
2.	Identifizierung von Replikations-defekten RP4-Mutanten	164
III.	<u>Genetische Charakterisierung Transcomplementations- abhängiger RP4-Mutanten</u>	168
1.	Vorbemerkungen	168
2.	Möglichkeiten der Überwindung des Rep ⁻ Phänotyps	169
2.1.	Integration von RP4-2::Mu ins Chromosom	169
2.2.	Rep-Reversion unter Verlängerung von RP4-2::Mu	170
2.3.	Rep-Reversion unter Verkürzung von RP4-2::Mu	171
2.4.	Rep-Revertanten mit unveränderter RP4-2::Mu Länge	172
2.5.	Verlust des RP4-2-Rep::Mu Plasmides	174
2.6.	Warum entstehen keine Plasmid-freien Zellen ?	175

3.	Quantitative Kreuzungsexperimente	177
3.1.	Warum sind R751 und RP4-7 nicht für Transcomplementation der Rep-Mutanten geeignet ?	177
3.2.	Kreuzungen zwischen Rep-Donoren und pSR120-Rezipienten	178
3.3.	RP4-5-4 complementiert nur echte Rep-Mutanten	182
IV.	<u>Kartierungen essentieller RP4-Gene</u>	183
1.	Die Replikationsfunktion trfB	184
2.	Die Replikationsfunktion trfA	186
3.	Die potentiell letale (kill-) Funktion des RP4-Plasmids	187
V.	<u>Ausblick</u>	193
F	<u>ANHANG</u>	
I.	Liste der verwendeten Abkürzungen	197
II.	Literaturverzeichnis	199

A ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden Fragen der Inkompatibilität und der Replikation des RP4-Plasmids behandelt. Die Ergebnisse lassen sich nach folgenden Gesichtspunkten gliedern:

1) Inkompatibilitätsuntersuchungen

Inkompatibilitätsreaktionen zwischen zwei verschiedenen markierten RP4-Plasmiden sind symmetrisch. Die gegenseitige Eliminierung der Plasmide erfolgt mit hoher Frequenz. Zwischen RP4 und dem miniRP4-Derivat pSR100 werden asymmetrische Inkompatibilitätsbeziehungen beobachtet; pSR100 wird von RP4 sehr stark verdrängt, während die umgekehrte Segregation nur selten gefunden wird. Die Ergebnisse werden anhand eines Replikonmodells diskutiert, das einen essentiellen Membranbindungsplatz für Plasmidreplikation fordert.

2) Konstruktion transcomplementationsabhängiger RP4-Mutanten

Es wurde ein Verfahren entwickelt, das mit hoher Ausbeute Mu-induzierte RP4-Mutanten liefert, die auf Transcomplementation durch pSR100 angewiesen sind, d.h. die in essentiellen Plasmidfunktionen mutiert sind. Trotz Inkompatibilität zwischen RP4-Mutanten und pSR100 läßt sich ein Transcomplementationssystem beider Plasmide relativ stabil in einer Zelle etablieren.

3) Genetische und physikalische Charakterisierung von transcomplementationsabhängigen RP4-Mutanten

Die genaue Kartierung der Mu-Insertionsorte ist über Heteroduplexanalysen möglich. Es wurden zwei Klassen von transcomplementationsabhängigen RP4-Mutanten gefunden:

- a) Mutationen in einer Replikationsfunktion des Plasmids
- b) Mutationen im Repressorsystem einer für die Wirtszelle letalen RP4-Funktion.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546216_0034

B. EINLEITUNG

Das Resistenzplasmid RP4 gehört zur Inkompatibilitätsgruppe IncP (1). Plasmide dieser Klasse zeichnen sich durch ihren weiten Wirtsbereich innerhalb der gram-negativen Bakterien aus (2;3;4).

Es ist anzunehmen, daß für die Eigenschaft, sich in vielen verschiedenen Bakterienstämmen etablieren zu lassen, neben Transfergenen auch oder vor allem Replikationsfunktionen der Plasmide von Bedeutung sind.

Um die weiteren Ausführungen auf eine breitere Basis zu stellen, ist es wichtig zu erwähnen, daß die P-Typ Plasmide RP4 und RK2 im Rahmen der Auflösungsgrenze von Heteroduplexanalysen identisch sind (5). Alle für RK2 veröffentlichten Ergebnisse sind daher mit großer Wahrscheinlichkeit auf RP4 übertragbar und umgekehrt.

RP4 ist der genetisch und physikalisch am besten charakterisierte Vertreter der IncP-Plasmid-Gruppe (6;7;8;9;10;11;12;13;14).

Man kennt die Schnittstellen für viele Restriktionsenzyme auf dem Plasmid, die Resistenzdeterminanten für Ampicillin (Ap), Kanamycin (Km) und Tetracyclin (Tc) sind kartiert, ebenso die Transferregionen.

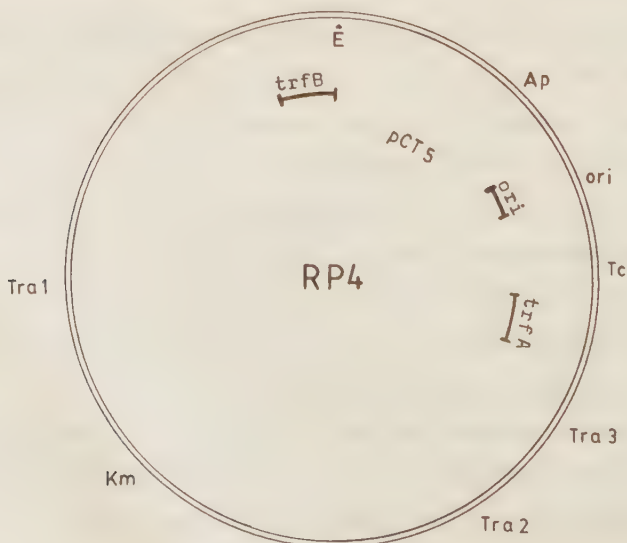
Über RP4-spezifische Replikationsgene war allerdings bis vor kurzem wenig bekannt. Man konnte die Lage von essentiellen Regionen nur sehr grob angeben, nachdem es sich als undurchführbar erwies, in einigen Bereichen des RP4-Plasmids Deletionen einzuführen (8;15).

An der Verkürzung von RP4 wurde schon seit einigen Jahren intensiv gearbeitet (8;15;16;17). Das Ziel dieser Bemühungen war es, ein möglichst kleines Replikon zu kon-

struieren, das als Vektorplasmid mit weitem Wirtsbereich eingesetzt werden könnte.

Der Helinski-Gruppe ist es in jüngster Zeit gelungen, die essentiellen DNA-Sequenzen des RK2- bzw. RP4-Plasmids sehr genau einzugrenzen. Die Startstelle der Plasmid-Replikation (origin) wurde durch elektronenmikroskopische Auswertung von Replikationsintermediaten ermittelt (18). Zwei weitere Replikationsfunktionen wurden gefunden, nachdem aus dem RK2-Molekül mit verschiedenen Restriktionsenzymen große Teile entfernt wurden. In dieser Hinsicht als besonders erfolgreich erwiesen sich partielle Verdauungen mit dem Enzym HaeII, das sehr viele Schnittstellen in RK2 erkennt. Auf diese Weise wurde das bisher kürzeste replikationsfähige RK2-Derivat, pCT5, konstruiert, das nur noch 5,4 kb des ursprünglich etwa 57 kb langen Wildtyp-Plasmides besitzt (19;20;21).

Die nachfolgende Skizze zeigt die wichtigsten der bisher verfügbaren Kartierungsdaten einschließlich der essentiellen RP4-Regionen, die auf dem Plasmid pCT5 vereinigt sind.



Die mit E bezeichnete einzige EcoRI-Schnittstelle dient als Orientierungspunkt auf RP4 (22).

Man erkennt neben den Resistenzdeterminanten Ap Tc und Km und den drei Transferregionen (Tra1,2 u.3) die minimale Replikationseinheit von RP4, die aus dem origin (ori) und den zwei Regionen trfA und trfB besteht. Die Abkürzung trf steht für "transacting replikation function". Durch Klonierung dieser Regionen auf miniF- und ColEI-Plasmidvektoren und entsprechende Transcomplementationsanalysen wurde gezeigt, daß dort Proteine codiert werden, die für die Replikation des bisher kürzesten miniRP4's pCT5 benötigt werden (19).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen Beitrag zur Analyse essentieller RP4-Funktionen zu leisten. Hierbei wurden Methoden verwandt, die sich grundsätzlich von denen unterscheiden, die zur Identifizierung von trfA und trfB geführt hatten. Anstelle von in-vitro Manipulationen, also Zerschneiden der Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen, Ligieren von DNA-Fragmenten bzw. Klonieren von RP4-Spaltstücken auf anderen Plasmidvektoren, wurde eine reine in-vivo Mutagenesetechnik zur Markierung von Replikationsgenen eingesetzt. Mutierte RP4-Plasmide sollten durch Transcomplementation mit anderen RP4-Derivaten stabilisiert werden, also nicht wie in den oben beschriebenen Arbeiten, von isolierten RP4-Fragmenten, die auf RP4-fremden Plasmidvektoren kloniert vorliegen.

Zur RP4-Mutagenese wurde der temperente E.coli Phage Mu verwendet (23). Das Mu-Genom kann an beliebigen Stellen der Wirts- DNA, also auch in Plasmiden inseriert werden (23;24;25;26;27;28;29).

In der vorliegenden Arbeit soll der Nachweis erbracht werden, daß unter geeigneten Versuchsbedingungen auch essentielle Plasmidfunktionen durch Mu-Insertion inaktiviert werden können. Gleichzeitig sollte dadurch eine in Heteroduplexanalysen sehr genau lokalisierbare Markierung der betreffenden Gene erreicht werden.

Bei der Nomenklatur der RP4-Mutanten ergaben sich zwei Probleme.

a) Definitionsgemäß werden Mu-Insertionsmutanten mit dem Zeichen " ::Mu " hinter dem mutierten Gen bezeichnet (30) (z.B. proA::Mu für eine Mu-Insertion in dem Gen proA). Bei den in der Arbeit verwendeten und neu isolierten RP4::Mu Hybridplasmiden waren jedoch die von Mu inaktivierten Gene nicht bekannt; die Mutationen wurden nur aufgrund des veränderten Phänotyps erkannt und beschrieben (z.B. Tetracyclin-sensitive, Transfer-defekte oder Replikations-defekte Mu-Insertionsmutanten). Die Bezeichnungen Tc::Mu, Tra::Mu oder Rep::Mu sind nach der in (30) gegebenen Definition nicht zulässig, da die Gene, die den jeweiligen Phänotyp ausprägen, nicht genau bezeichnet werden können. Um einen nach Mu-Insertion veränderten Plasmid-Phänotyp möglichst kurz beschreiben zu können, wurde daher das neue Zeichen " ;Mu " eingeführt (z.B. Tc;Mu für Tetracyclin-sensitiv oder Tra;Mu für Transfer-defekt).

b) Durch Mu-Insertion wurden RP4-Mutanten isoliert, die sich nur mit Hilfe eines anderen RP4-Derivates, also durch Transcomplementation, vermehren ließen. Es konnte bisher nicht näher definiert werden, welche Funktionen die

mutierten, offenbar essentiellen RP4-Gene besitzen, d.h. ob sie die Plasmidreplikation initiieren oder vollständig durchführen, ob sie bei der Verteilung der Plasmidkopien auf die Tochterzellen beteiligt sind oder andere Plasmidvermehrungsfaktoren darstellen.

Alle RP4-Mutanten, die sich nicht allein, d.h. ohne die Anwesenheit eines RP4-Transcomplementationspartners, vermehren lassen, wurden daher zusammenfassend mit "Replikations-defekt" (Rep^- oder $\text{Rep}::\text{Mu}$) bezeichnet.

C. MATERIAL und METHODEN

I. Medien, Zusätze, Puffer, Enzyme und Chemikalien

I.1. Nährmedien

PA : auf 1 l: 17,5g Penassay Broth (Difco)

RG : auf 1 l: 10 g Bacto tryptone (")

1 g Hefe Extrakt (")

8 g NaCl

1 g Glucose

RGM : wie RG, zusätzlich 4,9mM $MgCl_2$

RGMC : wie RGM, zusätzlich 2mM $CaCl_2$

RGNC : wie RG, zusätzlich 25-100mM Natriumcitrat

AM : E.coli Minimalmedium auf der Basis folgender

Salzlösung : auf 1 l Medium : 10,5g K_2HPO_4 ;
4,5g KH_2PO_4 ; 1g $(NH_4)_2SO_4$; 0,5g Natriumcitrat.

allgemeine Zusätze : 0,2% Glucose, 0,02% $MgSO_4$,
1 $\mu g/ml$ Thiamin, 40 $\mu g/ml$ Amino- bzw. Nukleinsäuren
(Amino- und Nukleinsäuren werden dem Bedarf, d.h.
den gewünschten Selektionsbedingungen angepaßt)
Die Zusätze werden nach dem Autoklavieren der
Salzlösung zugegeben.

I.2. Zusätze zu Nährmedien

Agar : 1,5% für Festmedien (außer RGMC)

1% für RGMC-Platten zur Phagenlysatzgewinnung

0,5% für RGMC-Weichagar

Antibiotikazusätze sind der folgenden Tabelle zu
entnehmen

Substanz	Abk.	Konz. ($\mu g/ml$)	Bezugsquelle
Ampicillin	Ap	100	Hoechst
Kanamycin	Km	25	Serva
Tetracyclin	Tc	10	Hoechst
Trimethoprim	Tp	50	Boeringer
Nalidixinsäure	Nx	100	Serva
Rifampicin	Rf	50	"
Streptomycin	Sm	200	"

I.3. Puffer

MP : Mu-Puffer

200mM NaCl; 20mM Tris; 2mM CaCl₂; 20mM MgSO₄;

0,1% Gelatine; pH 7,5

In diesem Puffer wurden alle Bakterien- und Phagenverdünnungsreihen angelegt.

TdP: Transduktionspuffer

10mM MgCl₂; 5mM CaCl₂; 10mM Tris; pH 7,5

DNA-Puffer :

TE : 10mM Tris; 1mM EDTA; pH 7,5

TE-0 : 50mM Tris; 20mM EDTA; pH 8

Elektrophoresepuffer :

TA : Trisacetat-Puffer :

40mM Tris; 10mM Natriumacetat; 1mM EDTA;

mit Eisessig auf pH 7,8

TB : Trisborat-Puffer :

90mM Tris; 90mM Borsäure; 2,5mM EDTA; pH 8,2

Spaltungspuffer :

Sma-Puffer : 15mM Tris; 15mM KCl; 6mM MgCl₂; pH 8,5

Hind-Puffer: 10mM Tris; 10mM MgCl₂; 50mM NaCl; pH 7,5

I.4. Enzyme und Chemikalien

Alle nicht einzeln aufgeführten Substanzen wurden von Merck, Darmstadt bezogen.

Serva, Heidelberg : Cytochrom-C Typ5, Ethidiumbromid, DNase, RNase, PEG6000, Visking Dialyseschlauch.

Agarose (Seakem, MCI Biochemicals, USA); Lysozym (Boeringer, Mannheim); Nitrocellulosefilter (Millipore, Neu-Isenburg); Sarkosyl NL30 (Geigy, Basel);

Restriktionsenzyme : EcoRI und SmaI (Dr.A. Rösch, Erlangen) PstI (Dr.H Mayer, Braunschweig)

II. Bakterienstämme, Plasmide und Phagen

II.1. Bakterienstämme

Die E.coli Stämme C600 sowie die CSH-Derivate 51, 52 und 57 wurden der Stammsammlung von A. Pühler, Erlangen, entnommen und mit den in der Tabelle aufgeführten zusätzlichen Mutationen bzw. Prophagen und Plasmiden versehen.

Stamm Nr.	Plasmid	genetische Markierungen bzw. Ableitung des Stammes
S291-2	RP4-2	C600: thi thr leu lac su _{III} tonA
CSH51	-	thi Δ (lac pro) ϕ 80dlac Sm
CSH52	-	thi Δ (lac pro) ϕ 80dlac Sm recA
S3031-01	pSR100	= CSH51 + Plasmid
S3031-02	pSR120	= CSH51 "
S3032-01	pSR100	= CSH52 "
S3032-02	pSR120	= CSH52 "
S3032-111	pSR100	= CSH52, zusätzlich: Mu _{cts} , Mu ^r
S302-20	-	= CSH52, zusätzlich: his::Mu, Rf
S302-30	pSR100	= S302-20 + Plasmid
S302-40	pSR120	"
S302-50	RP4-5-4	"
S302-70	R751	"
S302-80	RP4-7	"
S302-90	RP4-2	"
S302-91	RP4-2-Tra::Mu	"
S302-95	RP4-2 + F' lac::Tn1	"
S444-2	-	= CSH57: ara leu lacY purE gal trp his argG malA strA xyl mtl ilv metA thi zusätzlich Mu _{cts} Nx
C600	-	thi thr leu lac su _{III} tonA

II.2. Plasmide

Die folgende Tabelle enthält nur die Plasmide, die als Voraussetzung zur Durchführung der Arbeit bereits vorhanden bzw. zu diesem Zweck neu konstruiert wurden. Replikations-defekte RP4-2 Mutanten und deren Derivate sind in den Tabellen des Ergebnisteils aufgelistet.
Bezugsquellen : RP4 : A.Pühler; RP4-2 : P.Spitzbarth; RP4-5-4 und F'lac::Tn1 : U.Priefer; R751 : W.Gräf.

Plasmid	Bemerkung	Phänotyp
RP4-2	ISR1 Insertion + Deletion	Km Tc Tra ⁺
pSR100	miniRP4	Ap Tc Tra ⁻ Sex ⁻ Mob ⁻
pSR120	miniRP4::ColEI	Ap Tc Tra ⁻ Sex ⁻ Mob ⁺ Col ⁱ
RP4-5-4	ISR1 Insertio- nen+Deletionen	Tc Tra ⁻
R751	Wildtyp	Tp Tra ⁺
RP4-7	RP4-Tc::Tn7	Ap Km(Tn7: Tp Sm) Tra ⁺
RP4-Ap::Mu	Mu-Insertion	Km Tc Tra ⁺
RP4-Km::Mu	"	Ap Tc Tra ⁺
RP4-Tc::Mu	"	Ap Km Tra ⁺
RP4-2-Km::Mu	"	Tc Tra ⁺
RP4-2-Tc::Mu	"	Km Tra ⁺
RP4-2::Mu	"	Km Tc Tra ⁺
RP4-2-Tra::Mu	"	Km Tc Tra ⁻
F'lac::Tn1		Ap Tra ⁺

II.3. Phagenstämme

Die Mu-Phagen wurden aus den lysogenen Stämmen AT3397(Mu_c⁺) und MH149(Mu_{cts}) gewonnen (31).

Das P1kc Ausgangslysat stammt von R.Mattes, Regensburg. Es handelt sich um eine nicht näher definierte Mutante, die im Gegensatz zum Wildtyp-P1kc klare Plaques bildet. In der Arbeit wird dieser Phage nur mit P1 bezeichnet. Alle Phagen wurden auf C600 vermehrt.

III. Methoden

III.1. Bakterienanzucht und Kreuzungsmethoden

Flüssigkulturen wurden nach Suspendieren einer Einzelkolonie des betreffenden Stammes in 10 ml Medium durch Inkubation im Roller angezogen. Die optische Dichte (o.D.) der Kulturen wurde durch Messen der Absorption bei 650nm verfolgt.

Für quantitativ auszuwertende Plasmidtransferexperimente wurde eine logarithmisch wachsende Donorkultur mit ebenfalls logarithmisch wachsenden oder stationären Rezipientenzellen im Verhältnis 1:5 oder 1:10 gemischt.

Die Kreuzungsgemische wurden 1 Stunde oder länger auf Festmedien inkubiert, wobei zwei verschiedene Verfahren angewandt wurden.

a) Filterkreuzung

Hier wurden die Kreuzungsgemische auf sterile Nitrozellulose-Filter der Porengröße 0,45 μm aufgebracht. Die Filter wurden vorher auf relativ alte PA- oder RG-Platten gelegt und durch Vorinkubation auf Sterilität überprüft. Die Filtergröße richtete sich nach den Volumina der Kreuzungskulturen. Wenn nötig, wurde die aufzutragende Bakteriensuspension durch Zentrifugation eingeeengt. Die Kreuzungen wurden durch kräftiges Schütteln des Filters in 5-10ml Puffer abgebrochen.

b) Kreuzung in Eppendorfhütchen

In sterile Eppendorfhütchen wurden 0,5 ml PA- oder RG-Festmedium (nach dem Autoklavieren auf etwa 60°C abgekühlt) gegossen. Nach Erstarren des Mediums wurden Donor- und Rezipienten-Kulturen in die Hütchen pipettiert (zusammen etwa 0,5ml). Optimaler Zellkontakt wurde durch niedertourige Zentrifugation der Kreuzungshütchen in einem

Ausschwingrotor erreicht. Das Medium wurde abgegossen, die Bakterien befanden sich als dichter Rasen fest auf der Agarschicht des Hütchens. Die Kreuzung wurde durch Zugabe von 0,1 - 0,5 ml Puffer und kräftiges Schütteln abgebrochen. Der Bakterienrasen wurde hierdurch re-suspendiert.

Diese Methode erwies sich dann als besonders günstig, wenn eine große Anzahl von Kreuzungen unter gleichen Bedingungen durchgeführt und quantitativ ausgewertet werden sollte (vgl. Tab.12).

Die Transferfrequenzen wurden angegeben als Verhältnis von Transconjuganten-Titer zu Donor-Titer.

Für qualitative Kreuzungstests von Bakterienkolonien wurde ein Stempeltransferverfahren entwickelt, das wie folgt abläuft.

Geordnet angelegte Donor-Kolonien (20 Strichkolonien oder 50 punktförmige Kolonien, $\varnothing$ ca. 5mm) werden über Nacht frisch angezogen. Aus einer Übernacht-Kultur des Rezipientenstammes werden 0,5 - 2ml auf eine relativ alte PA- oder RG-Platte pipetiert und gleichmäßig verteilt. Das Medium zieht in die Agarschicht ein und es entsteht ein Rezipienten-Rasen von 10^9 oder mehr Zellen auf der Kreuzungsplatte. Die Donorkolonien werden durch Überstempeln auf den Rezipienten-Rasen übertragen. Die Kreuzungsplatten werden 6-12 Stunden bei 32°C inkubiert. Die Selektion von Transconjuganten-Kolonien beginnt mit Überstempeln der Kreuzungsplatte auf ein geeignetes Selektivmedium.

III.2. Phasenkontrastmikroskopie

Die Zellmorphologie von Bakterienstämmen wurde in einem Phasenkontrastmikroskop (Zeiss PM3) untersucht. Die Bakterienpräparate wurden auf einer dünnen Schicht Agar (1,5% in Puffer) angelegt, die sich zwischen Objektträger und Deckglas befindet. Hierdurch werden die Zellen immobilisiert.

Die Präparate wurden bei 250-facher Endvergrößerung auf Agfa-Pan-100 Film fotografiert.

III.3. Phagentechnologie

III.3.1. Phagenlysatzgewinnung

P1kc und Mu_C Lysate wurden durch konfluente Lyse in RGMC-Weichagar auf RGMC-Platten gewonnen. Die hierfür günstigsten Lysat-Verdünnungsstufen und Bakterientiter wurden in Vorversuchen ermittelt. Der Wirtsstamm für Mu_C war C600. Für die Gewinnung Plasmid-transduzierender P1kc-Lysate wurden C600-Stämme mit den entsprechenden Plasmiden eingesetzt.

Die Ernte der Lysate erfolgte nach 12 stündiger Inkubation (37°C) durch Überschichten der Platten mit MP und Abkratzen der Weichagarschicht. Nach zweimaliger Zentrifugation (5min bei 10000rpm) wurden die Lysate mit Chloroform sterilisiert und bei 4°C aufbewahrt.

III.3.2. P1-Transduktion

Die Rezipientenstämme wurden in RGMC-Medium über Nacht angezogen, abzentrifugiert und in TdP resuspendiert. 0,1 ml Bakterienkultur wurde mit P1-Lysat in einen Eppendorfhütchen gemischt. Das Lysatvolumen wurde so gewählt, daß eine Multiplizität von etwa 1 erreicht wurde. Der Transduktionsansatz wurde 30 min bei 37°C ruhig stehend inkubiert. Die Bakterien wurden dann pelletiert und in 0,2 ml RGNC-Medium aufgenommen. Nach einer Vorinkubation

(30 min bei 37°C) wurden die Zellen zur Selektion auf geeigneten Antibiotikamedien ausgespatelt.

III.3.3. Mu_C + Insertionsmutagenese

Von RP4 und RP4-2 wurden Mutanten durch Insertion des Mu_C + Phagengenoms in Antibiotikaresistenzgene bzw. in Transferegene erzeugt. Die Methodik der Mu-Mutagenese ist ausführlich in (31) erläutert.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Methode zur Konstruktion von Replikations-defekten Plasmid-mutanten ist eine Weiterentwicklung dieses Verfahrens und wird eingehend in Kapitel D.II. diskutiert.

III.4. Plasmid-DNA Isolierung und Charakterisierung

III.4.1. Plasmid-Kopienzahl-Bestimmung

Die Bestimmung der Kopienzahl von Plasmiden erfolgte durch analytische Ultrazentrifugation.

Die Bakterienkulturen wurden wie folgt lysiert:

- Ernte einer 10 ml Kultur (am Ende der log-Phase)
- Waschen in 250mM EDTA pH8
- Resuspendieren in 0,75 ml 20% Sucrose in TE
- Zugabe von 0,75 ml einer Lösung von 2mg/ml Lysozym und 1mg/ml RNase in TE
- nach 30 min bei 30°C Zugabe von 0,1 ml Sarkosyl (10% in 250mM EDTA)
- bis zum vollständigen Aufklaren in Eis
- Rohlysat 5 sec auf dem Vortex-Mixer scheren

Die Zentrifugation erfolgte in Doppelsektorzellen (Kel F Mittelstück 12 mm) des An-F-Ti Rotors der Beckmann Ultrazentrifuge Model E.

Die Eingangsdichte der CsCl-Lösung betrug 1,71 g/ml.

Im Probensektor waren 10-40 μ l Rohlysat enthalten.

Zentrifugationsbedingungen :

20-24 Std., 44000 rpm, 25°C

Auswertung

Ein photoelektrischer Scanner mißt die UV-Absorption (262-300 nm) der Proben. Die DNA-Verteilung im Gradienten wird mit einem externen Recorder (10'', Beckmann) aufgezeichnet.

Die Flächen der erhaltenen peaks sind den eingesetzten DNA-Mengen proportional. Das Verhältnis von chromosomaler zu Plasmid-DNA wird durch Vergleich der Flächen der jeweiligen peaks bestimmt. Hierzu werden die Kurven auf Transparentpapier übertragen, ausgeschnitten und auf einer Feinanalysenwaage gewogen. Aus den so ermittelten Mengenverhältnissen sowie den bekannten Längenwerten für Chromosom und Plasmid lassen sich die Plasmid-Kopienzahlen pro Chromosom in einer Zelle errechnen. Folgende DNA-Längen wurden verwendet :
E.coli Chromosom: $1,25 \times 10^3 \mu\text{m}$ (32), RP4-2: 19 μm ,
pSR100: 10 μm , pSR120: 12 μm .

III.4.2. Plasmidnachweis im Agarosegel

Das im folgenden beschriebene Verfahren ist eine Modifikation einer von J.B. Hansen und R.H. Olsen veröffentlichten Methode (33) zur Isolierung großer Plasmide. Durch die eingeführten Modifikationen wurde die Bakterienlyse vereinfacht und die Durchführung im "Mikromaßstab", d.h. mit kleinem Bakterienkultur- und Lysevolumen, ermöglicht.

Die im Lyserezept angegebenen Zeiten lassen sich in relativ weiten Grenzen variieren, ohne das Ergebnis zu beeinflussen.

- Suspendieren der Bakterienzellen in 150 μ l Sucrose (20% in TE-0) im Eppendorfhütchen durch
 - (a) Ernte einer 2-5 ml-Flüssigkultur oder
 - (b) Abkratzen einer Strichkultur mit einem Spatel
- Zugabe von 150 μ l Lysozymlösung (ca. 10mg/ml in 50mM Tris pH 8)
- 15 min bei RT oder in Eis
- Zugabe von 200 μ l EDTA (250mM pH8)
- 10 min bei RT
- Zugabe von 250 μ l SDS (15% in TE-0, ca. 90⁰C)
- 5 min bei 60-80⁰C im Wasserbad
- Zugabe von 250 μ l NaCl (5M in H₂O), sofort mischen
- 6 Std oder länger in Eis
- 10 min in der Eppendorfsentrifuge zentrifugieren (4⁰C)
- Überstand in Plastikröhrchen (Fraktionierröhrchen)
- Zugabe von 250 μ l PEG-Lösung (42% PEG6000 in H₂O)
- 6 Std oder länger in Eis
- Pelletieren der PEG-gefällten DNA im SW7,5-Rotor der Beckmann Kühlzentrifuge (5 min, 4000 rpm, 4⁰C)
- Überstand abkippen und PEG-Reste auswischen
- Pellet in 20-50 μ l Sucrose-BPB resuspendieren (10% Sucrose in TE mit Bromphenolblau gefärbt)
- hiervon 5-20 μ l direkt zur Gelelektrophorese verwenden (der Rest kann bei -20⁰C gelagert werden)

Agarosegelelektrophorese :

Für den Plasmidnachweis in Rohlysaten wurden 0,9%-ige Agarosegele in TB verwendet.

Elektrophoresebedingungen : 150V, 3-5 Std, in einer horizontalen oder vertikalen Gelapparatur (31).

(Färbung und Photographie siehe C.III.4.5.)

III.4.3. Plasmid-DNA Isolierung

Zur Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA wurde im Prinzip die gleiche Lysemethode wie in C.III.4.2. verwendet. Für eine 300-500 ml stationäre Bakterienkultur kann folgendes Rezept angegeben werden:

- Ernte der Bakterien im JA 14 Rotor der Beckmann Kùhlzentrifuge
- Waschen in 100 ml 100mM EDTA
- Resuspendieren in 19 ml Sucrose (20% in TE-0)
- Umfüllen in 250ml-Erlenmeyerkolben
- Zugabe von 30 ml Lysozymlösung (3mg/ml in 50mM Tris pH8)
- 30 min in Eis schütteln
- Zugabe von 40 ml EDTA (250mM in H₂O, pH8)
- 20 min bei RT stehen lassen
- Zugabe von 50 ml SDS (15% in TE-0, ca. 95°C)
- ca. 5 min im 95°C Wasserbad schütteln
- Zugabe von 50 ml NaCl (5M in H₂O), sofort gründlich mischen
- 6 Std oder länger in Eis
- SDS-NaCl-Niederschlag im JA14 Rotor abzentrifugieren (10 min, 14000 rpm, 0°C)
- Volumen des Überstandes abmessen
- Zugabe des 0,32-fachen Volumens einer PEG-Lösung (42% PEG6000 in H₂O), gründlich mischen

- 6 Std oder länger in Eis
- DNA-PEG-Niederschlag im SW7,5 Rotor pelletieren
(10 min, 4000 rpm, 0°C)
- Überstand abkippen und PEG-Reste mit Filterpapier entfernen
- Pellet in 8,5 ml TE resuspendieren
(Wenn die DNA-Lösung noch viel PEG oder Reste der SDS-NaCl Fällung enthält, kann sie durch Ausschütteln mit Chloroform-Isoamylalkohol, 24:1, gereinigt werden)
- 8 ml DNA-Lösung mit 8 gr CsCl und 0,35 ml EtBr-Lösung (20mg/ml in TE) in Zentrifugenröhrchen mischen
- Gleichgewichtszentrifugation im Ti50 oder Ti75 Rotor der Beckmann Ultrazentrifuge (ca. 48 Std, 34000 rpm, 20°C)
- Plasmid-Banden Abnahme durch seitliches Anstechen des UV-bestrahlten Zentrifugenröhrchens

Zur schnellen und sicheren Weiterverarbeitung der Plasmid-DNA hat sich folgendes Verfahren bewährt:

- Dialyse gegen TE (2x 2 Std)
- Phenolisieren (Phenol gesättigt mit Tris 100mM pH8)
(hierdurch wird gleichzeitig das EtBr aus der Probe entfernt)
- 300 µl phenolisierte DNA-Lösung mit 30 µl 3M Natrium-acetatlösung und 1 ml Äthanol (-20°C) in Eppendorf-hütchen mischen
- 5 min im Trockeneis/Äthanol-Bad (-70°C) abkühlen
- 10 min in der Eppendorffzentrifuge zentrifugieren
- DNA-Pellet zweimal mit 80% Äthanol waschen
- DNA-Pellet im Vakuum trocknen
- in 50 - 100 µl TE aufnehmen und bei -20°C oder 4°C lagern

III.4.4. Sucrosegradientenzentrifugation

Die Auftrennung von pSR100- und RP4-2::Mu-Plasmiden erfolgte durch Zentrifugation in einem Sucrose-gradienten (10-30%). Die Gradienten wurden durch Einfrieren (-20°C) und Auftauen (RT) einer sterilen Sucroslösung (20% in TE) in autoklavierten SW56-Polyallomer-Röhrchen vorbereitet (8).

Auf die Gradienten wurden 50 μl Äthanol-gefälltes Plasmid-DNA Gemisch aufgetragen.

Zentrifugationsbedingungen : SW 56-Ti Rotor der Beckmann Ultrazentrifuge, 110 min , 45000 rpm, 15°C , langsam beschleunigen und ohne Bremse auslaufen lassen. Der Fraktionierung in 10-20 Tropfen-Portionen schloß sich eine Agarosegelelektrophorese zur Plasmid-DNA Identifizierung an (vgl. Abb. 25/3). Die Fraktionen mit RP4-2::Mu DNA wurden dialysiert und durch Äthanol-fällung eingeeengt.

III.4.5. Restriktionsanalyse

Die optimalen DNA- und Enzymkonzentrationen wurden für jede Spaltung in Vorversuchen ermittelt.

Die benötigten Pufferkonzentrationen wurden durch Zugabe von 10x konzentriertem Restriktionspuffer eingestellt :

- Sma-Puffer für Spaltungen mit SmaI
- Hind-Puffer für Spaltungen mit EcoRI und PstI

Sma-Verdauungen wurden 1-2 Std bei RT , EcoRI- und PstI-Verdauungen 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Hitzeschock (5 min 70°C) gestoppt. Die Proben wurden durch Zusatz von Sucrose-Bromphenolblau für die Elektrophorese vorbereitet.

Die DNA-Fragmente wurden in einem 0,7%-igen Agarosegel in TA aufgetrennt. Laufbedingungen : 20V, 15 Std , RT, in einer vertikalen Gelapparatur.

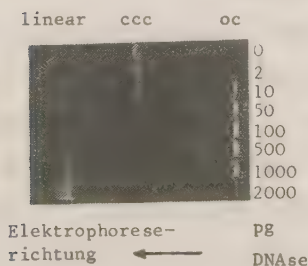
Nach Gelfärbung in einer EtBr-Lösung (1 µg/ml) wurden die Banden im UV-Durchlicht (254 nm Transilluminator, Hormuth u. Vetter) auf Polaroidfilm Typ 105 fotografiert.

III.4.6. Heteroduplexanalysen

(A) Vorbehandlung der Plasmid-DNA

Die nach der in C.III.4.3. beschriebenen Methode isolierte und aufbereitete Plasmid-DNA liegt fast zu 100% und sehr stabil in der ccc-Form vor (=Kovalent geschlossene Moleküle). Für Heteroduplexexperimente müssen die Plasmid-Moleküle jedoch in der oc-Form (=offene Plasmid-DNA-Moleküle mit einem Einzelstrangbruch) vorliegen, damit der Hitzedenaturierungsschritt zur Einzelstrangtrennung gelingt. Um Plasmid-DNA von der ccc- in die oc-Form Überzuführen, wurde eine schonende DNase-Behandlung durchgeführt. Hierzu wurden in den DNA-Proben optimale Nuklease-Bedingungen (5mM MgCl₂, 100mM Tris, 0,5mM EDTA, pH 8) (34) eingestellt. Die DNase-Reaktion wurde 10 min bei 30°C durchgeführt und durch Zugabe von EDTA (Endkonzentration des Ansatzes 10mM) sowie anschließende Phenolisierung gestoppt.

Die geeignete DNase-Konzentration wurde für jede Probe empirisch ermittelt, wie das folgende Beispiel zeigt.



RP4-DNA wurde unter den oben genannten Bedingungen mit den angegebenen Mengen DNase behandelt und im Agarosegel (1%, TB) analysiert. 10pg DNase Überführen die vorgelegte RP4-DNA zu etwa 50% in die oc-Form.

Proben in denen etwa 50% der Plasmide in der oc-Form vorliegen, sind optimal für Heteroduplexanalysen geeignet, da man davon ausgehen kann, daß jedes zweite Molekül einen Einzelstrangbruch besitzt.

Vor der Heteroduplexpräparation wurden die DNase behandelten Plasmide erneut Äthanol-gefällt, gewaschen und in TE möglichst konzentriert aufgenommen.

(B) Heteroduplexpräparation

Alle im folgenden verwendeten Puffer und Lösungen wurden in bidestilliertem Wasser angesetzt.

Die zu analysierenden DNA-Spezies wurden im Konzentrationsverhältnis 1:1 im Eppendorfhütchen gemischt (Endvolumen 5 μ l). Diese Mischung wurde mit 5 μ l Formamid versetzt und 2,5 min im Wasserbad gekocht. Nach Zugabe von 1 μ l Natrium-Perchlorat (2M in H_2O) erfolgte die Renaturierung bei 40°C im Wasserbad (30-120 min). Der Ansatz wurde mit 50%-igem Formamid (verd. in TE) auf ein Endvolumen von 20 μ l verdünnt. Der Verdünnungsschritt richtete sich nach der DNA-Konzentration der Proben und wurde empirisch optimiert. Gewöhnlich wurden 2 μ l des Renaturierungsansatzes mit 18 μ l 50%-Formamid versetzt. Nach Zugabe von 0,5 μ l Cytochrom-C (5mg/ml in H_2O) wurden 1-2 μ l mit einem Silikonschlauch entnommen und über eine Glaskapillarbühne auf eine 25%-ige Unterphase gespreitet.

(Unterphase : 25ml Formamid; 5ml 20xTe pH8,7; 70ml H_2O)

Das vorher auf die Unterphase gestreute Talkumpulver macht den gespreiteten Cytochrom-Film sichtbar. Mit einem parlodionbeschichteten Kupfernetz wird eine Stelle dieses Filmes abgenommen. Die DNA-Präparation wird in Uranyl-acetat-Lösung (10^{-5} M in 90% Äthanol, sterilfiltriert)

positiv kontrastiert, anschließend in 90% Äthanol gewaschen und an der Luft getrocknet.

Die Objektträger werden mit Pt/Ir und Kohle bedampft (Bedampfungsanlage Jeol JEE 4B).

Die elektronenmikroskopische Analyse erfolgte im Philips EM400.

Die Negative der elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden durch Projektion vergrößert und mit einem Längenmeßgerät ausgewertet. Ein bei gleicher Vergrößerung aufgenommener Gitterstandard lieferte den benötigten Umrechnungsfaktor zur Plasmidlängenbestimmung.

D. E R G E B N I S S E

I. Wechselwirkungen zwischen RP4-Derivaten

I.1. Vorbemerkungen

Wie dem Titel der Arbeit zu entnehmen ist, steht Transcomplementation zwischen Plasmiden an zentraler Stelle der Experimente. Plasmid-Transcomplementation bedeutet, daß Genprodukte eines Plasmids einem anderen, mutierten Plasmid des Systems zur Verfügung stehen.

In Kapitel I ist die Auswahl eines hierfür geeignet erscheinenden RP4-Plasmidsystems beschrieben.

Außerdem soll untersucht werden, welche Wechselwirkungen zwischen den RP4-Replikons auftreten können.

Die wesentliche Frage dabei war, ob sich ein theoretisch mögliches Transcomplementationssystem in der Praxis genügend stabil etablieren läßt.

I.1.1. Kurze Darstellung des Grundkonzepts der Arbeit

Um die in Kapitel D.I. beschriebenen Vorversuche im Zusammenhang zum Hauptteil darstellen zu können, soll zunächst anhand der Abb.1 das Grundkonzept der vorliegenden Arbeit erläutert werden.

Aus einem RP4-Plasmid R soll eine Replikations-defekte Mutante R-Rep erzeugt werden. Dies geschieht durch Mu-Insertions-Mutagenese (Abb.1/1).

Replikationsgene sind essentielle Plasmidfunktionen.

Eine Mutation in einem Replikationsgen muß sofort kompensiert werden, um das mutierte Plasmid für weitere Untersuchungen zu erhalten. Daher wird das Plasmid R-Rep in einen neuen Stamm transferiert, der ein anderes RP4-Derivat R' enthält. Transcomplementation durch R' sollte dann die Replikation von R-Rep ermöglichen (Abb.1/2).

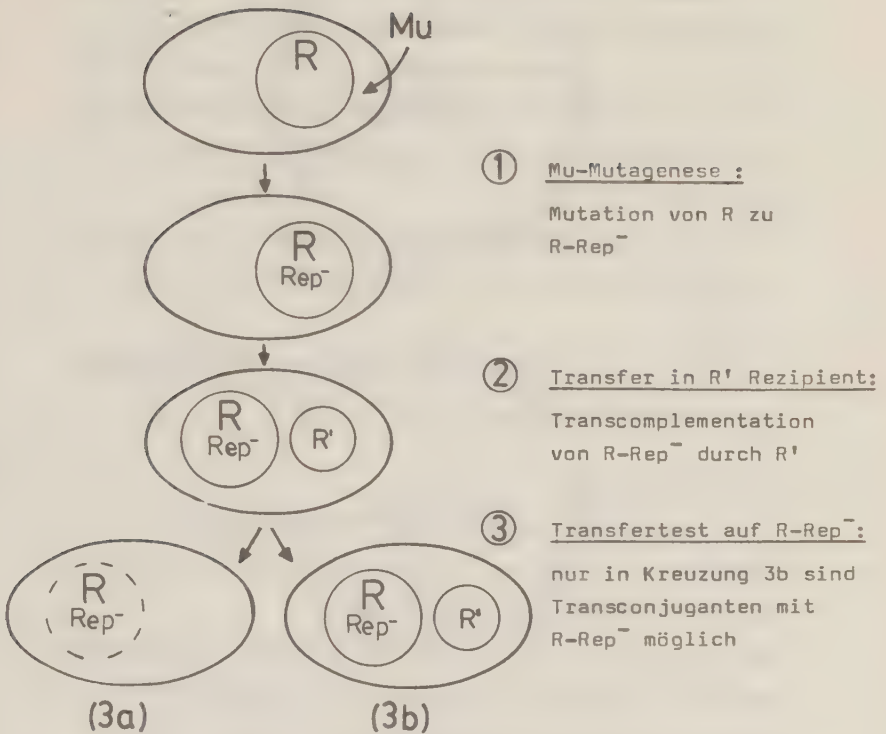


Abb. 1 : Schematische Darstellung des Grundkonzepts
der Arbeit

R und R' sind verschiedene RP4-Derivate.

R wird zu $R\text{-Rep}^-$ mutiert und dann von R' trans-
complementiert.

Der eigentliche Test auf R-Rep ist dann in einem weiteren Transferexperiment mit zwei verschiedenen Rezipienten möglich. Nur in einem Rezipienten, der R⁺ besitzt, kann Transcomplementation von R-Rep stattfinden und nur mit diesem Stamm lassen sich Transconjuganten erhalten (Abb.1/3).

Aus dem Versuchskonzept der Abb.1 ergeben sich mehrere Vorbedingungen, die die verwendeten Plasmide erfüllen müssen.

Die Auswahl eines theoretisch geeigneten Plasmidsystems soll im folgenden erläutert werden.

I.1.2. Das Plasmidsystem

Eine wesentliche Voraussetzung für Mu-Insertions-Mutagenese ist, daß das zu mutierende Plasmid funktionsfähige Transfereigenschaften besitzt.

Die Partner eines Plasmid-Transcomplementationskomplexes müssen sich bezüglich der Marker unterscheiden lassen, damit auf das mutierte Plasmid selektioniert werden kann.

Beide Voraussetzungen erfüllt das RP4-Derivat RP4-2 (Abb.2a). Dieses Plasmid wurde von P.Spitzbarth ausführlich beschrieben (35). Für die vorliegende Arbeit sind folgende Eigenschaften wichtig. RP4-2 ist transferierbar (Tra⁺) und trägt die Antibiotikaresistenzmarker Km^r und Tc^r. Im Ampicillin-Transposon Tn1 des RP4-Moleküls ist das Insertionselement ISR1 inseriert. Neben der Insertionsstelle erstreckt sich eine Deletion in das Ampicillinresistenzgen. Zellen mit RP4-2 sind daher stabil Ap^s.

Als mögliche Complementationspartner für RP4-2-Rep-Mutanten boten sich pSR100 und pSR120 aus folgenden Gründen an:

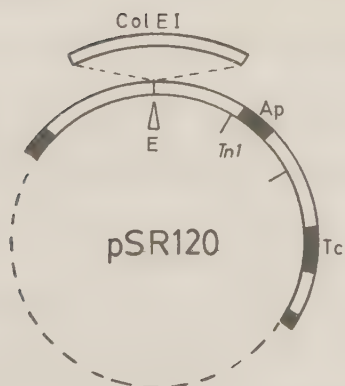
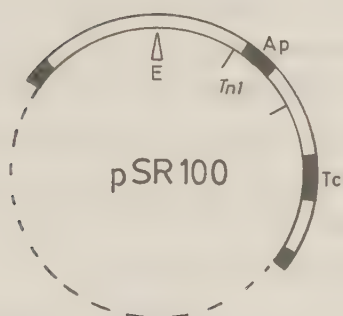
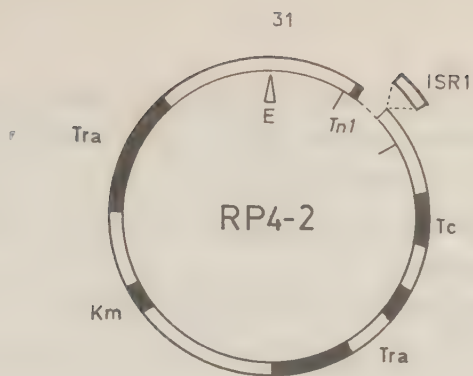


Abb. 2 : Das Plasmidsystem

Die Eigenschaften der Plasmide sind in D.I.1.2 beschrieben. Zur Orientierung ist die EcoRI-Schnittstelle markiert (E). Unterbrochene Kreislinien zeigen Deletionen an.

pSR100 ist eine Deletionsmutante von RP4 (31;36), die große Teile der Transfer-Region sowie die Km^R -Determinante verloren hat (Abb.2.b).

RP4-2 und pSR100 unterscheiden sich also in zwei Resistenzmarkern:

RP4-2 ($\underline{Ap}^S \underline{Km}^R Tc^R$) ; pSR100 ($\underline{Ap}^R \underline{Km}^S Tc^R$)

pSR120 ist ein zusammengesetztes Plasmid, das aus pSR100 und ColE1 besteht. Das ColE1 Plasmid wurde in die EcoRI-Schnittstelle von pSR100 eingefügt (37) (Abb.2.c).

Die EcoRI Schnittstellen liegen weder bei pSR100 noch bei ColE1 in essentiellen Genen. pSR120 wurde zunächst mit in die Auswahl der Complementationspartner aufgenommen, da die zusätzliche, von RP4 unabhängige Replikationseinheit (ColE1) evtl. von Vorteil bei möglichen Co-Stabilitätsproblemen sein könnte.

Aus der Abb.1 läßt sich ableiten, daß neben der erwähnten leichten Unterscheidbarkeit der Complementationspartner noch weitere Voraussetzungen an das Plasmidsystem zu stellen waren.

Mutierte RP4-2 Plasmide müssen sofort nach der Mutagenese zu einem geeigneten Complementationspartner transferiert werden. Dieser darf also die Aufnahme von RP4-2-Mutanten nicht wesentlich beeinträchtigen.

Weiter war zu fordern, daß die complementierenden Plasmide weder transferierbar noch mobilisierbar sind, um den in Abb.1 Pkt.3 schematisierten Transfertest durchführen zu können.

Diese beiden Fragen werden in Kapitel D.I.2. untersucht.

Verwandte Plasmide lassen sich normalerweise aufgrund von Inkompatibilitätsreaktionen nicht stabil in einer Zelle etablieren. Das war auch für RP4-2 und pSR100 zu erwarten. Eine gewisse Costabilität ist jedoch Voraussetzung für ein wirksames Transkomplementationssystem. Dem Problem der Inkompatibilität zwischen RP4-Derivaten wurde daher ein eigenes Kapitel (D.I.3.) gewidmet.

I.2. Wechselwirkungen von RP4-2 mit pSR100 und pSR120 nach Konjugation

I.2.1. Vergleich von recA^+ und recA^- Rezipienten

Tab.1 zeigt die Ergebnisse erster Kreuzungsversuche. Zur Auswahl standen die Stämme CSH 51(recA^+) und CSH 52(recA^-). Beide Stämme sind isogen bis auf die recA Mutation in CSH 52. Aufgrund der chromosomal codierten Streptomycinresistenz (Sm^r) sind sie als Rezipienten für Transferexperimente mit Sm^s Donoren geeignet.

In einer ersten Kreuzungsserie konnte gezeigt werden, daß CSH 51 und CSH 52 das RP4-2 Plasmid gleich gut aufnehmen (Tab.1 Test 1 und 2). Die Transferfrequenzen erreichen bei Filterkreuzungen bis 100% Plasmidtransfer (bezogen auf den Donortiter).

In den folgenden Tests wurde der Einfluß von pSR100 und pSR120 auf die RP4-2 Transferfrequenz untersucht.

Das Wildtyp-RP4-Plasmid besitzt die genetische Determinante "Sex" = surface exclusion, d.h. RP4 codiert für ein oberflächen-spezifisches Produkt, das die Fähigkeit einer Zelle, ein weiteres RP4-ähnliches Plasmid durch Konjugation aufzunehmen, stark reduziert (8).

Test Nr 3 und 5 der Tab.1 beweisen, daß pSR100 keinen Einfluß auf die Aufnahmefähigkeit der Zellen für

Test Nr.	Rezipienten			Transfer- frequenz	Nachtest von Km^r -		
	Stamm	recA	Plasmid		Km	Tc	Ap
1	CSH 51	+	-	100	50	50	0
2	CSH 52	-	-	100	50	50	0
3	S3031-01	+	pSR100	100	50	50	38
4	S3031-02	+	pSR120	3	50	50	45
5	S3032-01	-	pSR100	100	50	50	0
6	S3032-02	-	pSR120	0,06	50	50	1

Tab. 1 : Wechselwirkungen von RP4-2 und pSR100 und
pSR120 in $recA^+$ und $recA^-$ Stämmen

Die Kreuzungen wurden nach der Filtermethode durchgeführt. Der Donorstamm war S291-2 (RP4-2). Die Rezipienten unterscheiden sich in der $recA$ -Eigenschaft und im Plasmidgehalt.

Die Transferfrequenzen sind bezüglich des Donortiters in % angegeben.

Im Nachtest wurden Km^r (RP4-2) Transconjuganten durch Überstempeln auf die angegebenen Antibiotikamedien auf ihren Plasmidgehalt untersucht.

Die Ergebnisse sind in D.I.2.1. erläutert.

RP4-2 hat. Damit ist gezeigt, daß pSR100 die Sex-Eigenschaft nicht mehr besitzt.

Dagegen reduziert pSR120 die Transferfrequenz von RP4-2 auf 3% im Rec⁺ Stamm (Tab.1, Test 4) und auf 0,06% im Rec⁻ Stamm (Tab.1, Test 6). Dieser Effekt kann nicht mit "surface exclusion" erklärt werden, da pSR120 nicht mehr RP4-spezifische Sequenzen besitzt als pSR100. Die veränderten Eigenschaften müssen eine Folge des zusätzlichen ColE1 Replikons sein. Dieses Problem wird in Abschnitt D.I.3.4. im Zusammenhang mit Inkompatibilitätsuntersuchungen noch einmal aufgegriffen.

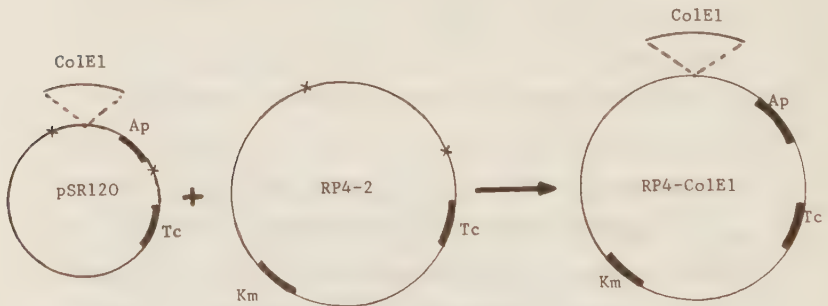
RP4-2 und pSR100 leiten sich vom gleichen Replikon ab. Sie sollten daher inkompatibel sein, d.h. sich gegenseitig verdrängen.

Bei den oben beschriebenen Kreuzungen wurden RP4-2-Transconjuganten auf Km, d.h. auf das Donorplasmid, selektioniert. Km^r Kolonien wurden durch Überstempeln auf 3 Antibiotikaplatten nachgetestet. Interessant war die Ap-Platte, da Ap-Resistenz nur von den ursprünglich im Rezipienten vorhandenen miniRP4-Derivaten pSR100 oder pSR120 vermittelt werden kann.

Die beiden Rec⁺ Stämme (Tab.1, Test 3 und 4) zeigen einen erstaunlich hohen Prozentsatz an Ap^rKm^r Kolonien, was zunächst auf die Anwesenheit von Donor- und Rezipienten-Plasmid in den meisten Transconjuganten hindeutet.

Ein wesentlich stärkerer Verdrängungseffekt kann in den Kreuzungen 5 und 6 (Tab.1) demonstriert werden: RP4-2 verdrängt sowohl pSR100 als auch pSR120 aus den Rec⁻ Rezipienten, angezeigt durch den Verlust der Ap-Resistenz der Transconjuganten.

Für das unterschiedliche Verhalten von Rec^+ und Rec^- Rezipienten bietet sich folgende Erklärung an .
 In den Rec^+ Stämmen könnten sehr häufig Rekombinationen zwischen Donor-und Rezipienten-Plasmid stattfinden, die zur stabilen Anwesenheit der drei Antibiotika-Resistenz Marker führen. Tatsächlich konnten in weiteren Untersuchungen solcher $\text{Ap}^r \text{Km}^r \text{Tc}^r$ Transconjuganten nie zwei voneinander unabhängige Plasmide gefunden werden. Vielmehr resultierten aus Kreuzung 4 (Tab.1) mit hoher Frequenz RP4-Col-Hybridplasmide ($\text{Ap}^r \text{Km}^r \text{Tc}^r \text{Col}^i$). Deren Entstehung könnte durch Rekombination zwischen RP4-2 und pSR120 erklärt werden, wie die nachstehende Skizze zeigt :



Die mit X gekennzeichneten Sequenzen könnten die Stellen reziproker Rekombination sein.

Die Ergebnisse der Tabelle 1 lassen sich wie folgt zusammenfassen :

- pSR100 besitzt nicht mehr die RP4-spezifische surface exclusion Eigenschaft.
- pSR120 verhindert auf bisher ungeklärte Weise die Aufnahmefähigkeit einer Zelle für RP4-2.
- In Rec^+ Stämmen lassen sich RP4-Derivate nicht als unabhängige Replikons etablieren .
- Aus Rec^- Rezipienten werden die miniRP4-Plasmide pSR100 und pSR120 verdrängt.

I.2.2. Verhalten der Plasmide nach Coselektion

In diesem Abschnitt sollen die Wechselwirkungen zwischen RP4-Derivaten im Rec^- Stamm genauer behandelt werden.

Zunächst wurde getestet, ob durch Coselektion auf zwei Plasmide das Problem der Inkompatibilität umgangen werden kann.

Wie das Kreuzungsschema der Tab.2 zeigt, wurde RP4-2 in Rec^- Rezipienten transferiert, die entweder pSR100 (S3032-01) oder pSR120 (S3032-02) enthielten.

Die relevanten Resistenzmarker der Plasmide sind ebenfalls gezeigt. Daraus ist ersichtlich, daß bei Doppelselektion auf Ap- und Km-Resistenz nur Transconjuganten mit beiden Plasmiden wachsen dürften.

Nachtest 1 (Tab.2) untersucht die Stabilität beider Plasmide. Von der Coselektionsplatte wurden Kolonien direkt auf die einzelnen Antibiotikaplatten übertragen. Alle Kolonien der Coselektionsplatte waren im Nachtest Km^r , was die Anwesenheit von RP4-2 anzeigt. Dagegen waren nur noch 1-4 Kolonien von 50 getesteten Ap^r , d.h. die Rezipienten-Plasmide pSR100 und pSR120 wurden in den meisten Fällen trotz Coselektion verdrängt.

Folgende Überlegungen könnten dieses Ergebnis erklären. Die Ap-Resistenz einer RP4 tragenden Zelle beruht auf der vom bla-Gen spezifizierten β -Lactamase, einem Enzym das Penicillin-Derivate abbaut (39). Dieses Enzym wird von den resistenten Zellen ins Medium ausgeschieden (40), wo es nach und nach das selektive Agens Ap abbaut. Damit wird aber der Selektionsdruck entfernt, der normalerweise nur das Wachstum von Ap^r -Zellen erlauben würde.

Donor	 S291-2 (RP4-2)			
Rezipienten	S3032-01 S3032-02 recA Sm (pSR100) recA Sm (pSR120) 			
Coselektion	Ap Km Sm			
Nachtest ①	Stabilität der Plasmide : Markertest von je 50 Kolonien der Coselektion			
Test auf	RP4-2	pSR100	RP4-2	pSR120
Sel. Medium	KmSm	ApSm	KmSm	ApSm
Kolonien	50	1	50	4
Nachtest ②	Mobilisierbarkeit der Plasmide : Weiterkreuzung mit S302-20 recA Rf			
Donor-plasmide	RP4-2 ①	pSR100	RP4-2 ②	pSR120
Transconjuganten auf	KmRf	ApRf	KmRf	ApRf
Titer	4×10^4	0	3×10^4	7×10^4

Tab. 2 : Costabilitäts- und Mobilisierungsversuche

RP4-2 wurde mittels Filterkreuzung in die beiden im oberen Teil der Tabelle gezeigten Rezipienten transferiert. Durch ApKmSm-Selektion sollten Transconjuganten mit Donor- und Rezipienten-Plasmid isoliert werden.

Nachtest 1 untersucht die tatsächliche Stabilität der Plasmide.

Im Nachtest 2 werden die beiden Rezipienten-Plasmide auf ihre Mobilisierbarkeit getestet.

Die Ergebnisse werden in D.I.2.2. besprochen.

Trotz Coselektion auf beide Plasmide wirkt sich die Incompatibilität ähnlich aus wie bei einfacher Selektion auf RP4-2 : die miniRP4-Plasmide (pSR100 und pSR120) werden verdrängt. Die wenigen Zellen einer Mischkolonie, die noch echt Ap^R sind, produzieren offenbar genügend β -Lactamase, um normales Koloniewachstum zuzulassen.

Wie in den Vorbemerkungen (I.1.1.) erwähnt, darf der miniRP4 Partner, der später Replikations-defekte RP4-2 Mutanten complementieren soll, weder transferierbar noch mobilisierbar sein.

Diese Frage wird im Nachtest 2 der Tab.2 untersucht. Aus Nachtest 1 wurden Kolonien gewählt, die sowohl auf Km als auch auf Ap Medium wuchsen. Diese Kolonien dienten als Donorkulturen in einer weiteren Kreuzung. Aufgrund der oben angestellten Überlegungen handelt es sich hierbei vermutlich um eine gemischte Population aus Ap^R (pSR100/120), Km^R (RP4-2) sowie $Ap^R Km^R$ - Zellen. Der Transfer von RP4-2 in einen neuen Rezipienten sollte somit möglich sein. Rf diene zur Donor-Gegenselektion. Selektion auf Km liefert den Nachweis von RP4-2-Übertragung aus den beiden Mischkulturen A und B.

Parallel dazu wurden die Kreuzungsansätze A und B auf Ap selektioniert, womit die Übertragung von pSR100 (A) oder pSR120 (B) nachweisbar wäre.

Es zeigte sich, daß in keinem Fall pSR100 transferiert oder von RP4-2 mobilisiert wurde.

pSR120 besitzt ebenso wenig wie pSR100 ein eigenes Transfersystem. Der hohe Transconjugantentiter auf Ap^R in Kreuzung B zeigt somit, daß pSR120 von RP4-2 sehr effektiv mobilisiert wird. In Parallelversuchen konnten nachgewiesen werden, daß RP4 in der Lage ist, ColE1-Plasmide zu

mobilisieren. Das RP4/ColE1-Mobilisierungssystem ist also auch im Fall von pSR120 (miniRP4:ColE1) aktiv.

I.3. Inkompatibilität zwischen RP4-Derivaten

Die bisher beschriebenen Versuche zeigten, daß RP4-2 die miniRP4-Plasmide pSR100 und pSR120 nach Konjugation aus den Rezipientenzellen verdrängen kann.

In Kapitel I.3. soll das Phänomen der Inkompatibilität zwischen RP4-Plasmiden näher untersucht werden.

I.3.1. Plasmidauswahl

In Tab.3 sind die Plasmide zusammengefaßt, mit denen die anschließenden Untersuchungen durchgeführt wurden.

Es handelt sich um die bereits vorgestellten miniRP4-Derivate pSR100 und pSR120 sowie um neue RP4-Mutanten, die aus folgenden Gründen für genauere Inkompatibilitätstests konstruiert wurden.

a) Es sollte getestet werden, ob sich RP4-2 im Inkompatibilitätsverhalten von RP4 unterscheidet; daher wurden drei RP4-Mutanten miteinbezogen.

b) In den vorhergehenden Abschnitten hat es sich gezeigt, daß der Marker Ap^r nicht unbedingt geeignet ist, um aus einem Kreuzungsgemisch eindeutig Ap^r Zellen zu selektionieren. Wenige echt Ap^r Zellen in einer Mischpopulation genügen offenbar, um durch Abbau von Ampicillin das Wachstum einer überwiegend aus Ap^s Zellen bestehenden Kolonie auf Ap-Selektionsmedium zu ermöglichen.

Daher wurden neue Mutationen in RP4-2 bzw. RP4 eingeführt. Durch Mu-Insertionsmutagenese wurden die Gene für Km- bzw. Tc-Resistenz ausgeschaltet.

Plasmid	Bemerkung	relevante Marker
pSR100	miniRP4	Ap - Tc -
pSR120	miniRP4:: ColE1	Ap - Tc - Col^i
RP4-Ap:: μ	Mu-Insertions- Mutanten	- Km Tc Tra
RP4-Km:: μ		Ap - Tc Tra
RP4-Tc:: μ		Ap Km - Tra
RP4-2-Km:: μ		- - Tc Tra
RP4-2-Tc:: μ		- Km - Tra

Tab. 3 : Plasmidauswahl für Incompatibilitätsversuche:

Die miniRP4-Plasmide pSR100 und pSR120 wurden in Abb.2 beschrieben. In den RP4- bzw. RP4-2-Mutanten wurden die einzelnen Resistenzgene durch Mu-Insertion ausgeschaltet.

Kontrollversuche zeigten, daß Km- und Tc-Selektion das Wachstum sensitiver Zellen auch in Zellgemischen mit resistenten Stämmen wirksam unterdrückt.

I.3.2. Methodik der Incompatibilitätsuntersuchungen

Um das Incompatibilitätsverhalten einer bestimmten Plasmidkombination untersuchen zu können, müssen beide Plasmide wenigstens vorübergehend in einer Zelle zusammengebracht werden. In Kapitel I.2. wurde hierzu ein Donor-Plasmid durch Konjugation zu einem Rezipientenplasmid transferiert.

Dieses Verfahren ist nur bei Plasmiden möglich, die ein eigenes Transfersystem besitzen oder sich mobilisieren lassen. Beides trifft für pSR100 nicht zu.

Um auch pSR100 als Donorplasmid verwenden zu können, wurde für alle weiteren Tests als einheitliche Plasmid-Übertragungsmethode die P1-Transduktion gewählt.

P1 transduziert alle getesteten RP4-Derivate etwa gleich gut; entsprechende P1-Lysate wurden nach der in C.III.3.1. beschriebenen Methode gewonnen.

Die Incompatibilitätstests wurden nach dem in Abb.3 gezeigten allgemeinen Schema durchgeführt.

Abb.3 Punkt 1 : Transduktion :

Im ersten Schritt wird ein Donorplasmid (D) mittels Transduktion in einen Rezipientenstamm eingeführt, der bereits ein verwandtes Plasmid (R) enthält.

Beide Plasmide tragen unterschiedliche Resistenzmarker (hier D: Tc^R; R: Km^R). Der Rezipientenstamm ist recA⁻. Das genaue Transduktionsverfahren ist in C.III.3.2. beschrieben.

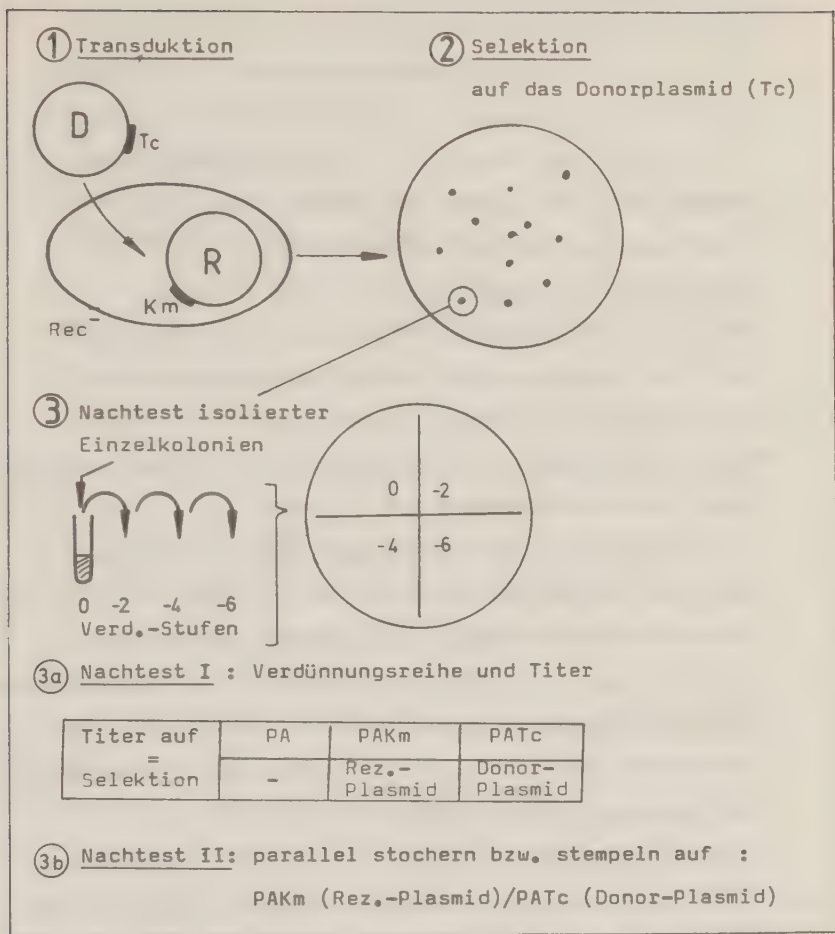


Abb. 3 : Methodik der Inkompatibilitätstests

Die Abbildung zeigt den schematisierten Versuchsablauf der Inkompatibilitätstests zwischen RP4-Derivaten.

Die einzelnen Punkte werden in D.I.3.2. behandelt.

D = Donor-Plasmid , R = Rezipienten-Plasmid

Abb.3 Punkt 2 : Selektion :

Durch Ausplattieren auf Tc-haltigem Medium wird auf das Wachstum von Transduktanten mit dem Donorplasmid selektioniert. Bei einem incompatiblen Plasmidpaar ist zu erwarten, daß hierbei das Rezipientenplasmid verdrängt wird. Das Ausmaß der Verdrängung wird in den anschließenden Nachtests festgestellt.

Abb.3 Punkt 3 : Nachtest :

Einzelkolonien der ersten Selektionsplatte werden in kleinen Volumina Puffer suspendiert; davon werden Verdünnungsreihen angelegt. Diese werden nach dem in Abb.3 Pkt.3a gezeigten Schema parallel auf drei verschiedene Platte ausgespatelt :

- auf der ersten Platte (PA) wird nicht selektioniert; sie gibt den Gesamtzelltiter der untersuchten Kolonie an.
- auf der zweiten Platte (Km) wachsen die Zellen zu Kolonien an, die noch das ursprüngliche Rezipientenplasmid enthalten (trotz Selektion auf das neue Donorplasmid).
- auf der dritten Platte (Tc) wachsen nur solche Zellen, die das Donorplasmid stabil etabliert haben.

Diese Titerergebnisse liefern den in den folgenden Tabellen verwendeten "Rezipienten-Plasmid-Verdrängungs-Faktor". Dieser ist definiert als das Verhältnis von Zellen, die noch das Rezipienten-Plasmid besitzen zum Gesamttiter der Zellen der untersuchten Einzelkolonie. Er gibt somit Auskunft über das Ausmaß der Segregation Rezipienten-Plasmid-freier Zellen bei Selektion auf das Donor-Plasmid.

Falls der Nachtest 3a keine eindeutigen Aussagen liefert, d.h. keine starke Segregation des Rezipienten-Plasmids festzustellen ist, können in Nachtest 3b genauere Werte über die prozentuale Zusammensetzung der Kolonie der

Primärselektion gewonnen werden, indem gereinigte Einzelkolonien parallel auf die jeweiligen Antibiotika-Platten übertragen werden.

I.3.3. Transduktionstest A :

Wechselwirkungen zwischen RP4-Mutanten untereinander und mit pSR100 als Rezipientenplasmid

In Vorversuchen konnte gezeigt werden, daß die Transduktionsfrequenzen weitgehend unabhängig davon sind, ob im Rezipienten bereits ein Plasmid anwesend ist oder nicht. Die entsprechenden Kontrollen (d.h. Rezipient ohne Plasmid) sowie die einzelnen Transduktionsfrequenzen wurden daher nicht in die folgenden Tabellen aufgenommen.

A-1 : RP4-Mutanten als Rezipienten-Plasmide

In einer ersten Transduktionsserie wurde das Inkompatibilitätsverhalten von Wildtyp-RP4- und RP4-2-Mutanten untereinander untersucht (Tab.4).

Die verschiedenen Mutationen in Resistenzmarkern erlauben eine Unterscheidung von Donor- und Rezipientenplasmid und somit die Selektion auf das jeweilige Donorplasmid. Gemäß dem Schema in Abb.3 wurden je drei Einzelkolonien pro Ansatz nach der Primärselektion auf das Donorplasmid durch Titern auf den drei verschiedenen Medien nachgetestet. Die Titerergebnisse lieferten in allen Fällen einen Rezipienten-Plasmid-Verdrängungsfaktor von $\leq 10^{-7}$, d.h. maximal eine von 10^7 Zellen der getesteten Einzelkolonie besitzt noch das ursprüngliche Rezipientenplasmid, nachdem die Kolonie unter Selektionsdruck auf das Donor-Plasmid gewachsen war.

Aus Tab.4 lassen sich folgende Ergebnisse zusammenfassen: Das jeweilige Donorplasmid wird im Rezipienten effektiv etabliert, das ursprüngliche Rezipientenplasmid wird

Donor-Plasmid	Rez.-Plasmid	Sel. Medium	Einzel-Kolonie Nachtest	Rez.-Plasmid Verdrängungs-Faktor
RP4-Km $\pm$ Mu	RP4-Tc $\pm$ Mu	Tc	3	$\leq 10^{-7}$
RP4-Km $\pm$ Mu	RP4-2-Tc $\pm$ Mu	Tc		
RP4-Tc $\pm$ Mu	RP4-Km $\pm$ Mu	Km		
RP4-Tc $\pm$ Mu	RP4-2-Km $\pm$ Mu	Km		
RP4-2-Tc $\pm$ Mu	RP4-Km $\pm$ Mu	Km		

Tab. 4 : Transduktion A-1 : Inkompatibilitätstest zwischen
RP4- Mutanten

Donor-Plasmid	Rez.-Plasmid	Sel.- Medium	Einzel-Kolonie Nachtest	Rez.-Plasmid Verdrängungs-Faktor
RP4-Ap $\pm$ Mu	pSR100	Km	5	$\leq 10^{-8}$
RP4-Tc $\pm$ Mu				
RP4-2				
RP4-2-Tc $\pm$ Mu				

Tab. 5 : Transduktion A-2 : Inkompatibilitätstest zwischen
RP4-Mutanten und pSR100 als Rezipienten-Plasmid

dann sehr stark verdrängt. Diese Aussage ist unabhängig von der Transduktionsrichtung (z.B. RP4-Km::Mu zu RP4-Tc::Mu oder umgekehrt) bzw. den Selektionsbedingungen (Tc oder Km). RP4 und RP4-2 verhalten sich gleich, d.h. die Mutation in Tn1 von RP4-2 hat keinen Einfluß auf die Inkompatibilitätseigenschaften.

A-2 : pSR100 als Rezipienten-Plasmid

Tab.5 zeigt die Ergebnisse analoger Versuche mit RP4-Mutanten als Donor-Plasmide und pSR100 als Rezipienten-Plasmid. Hier liegt der Verdrängungsfaktor für das Rezipienten-Plasmid bei $\leq 10^{-8}$. pSR100 wird also sehr effektiv von RP4 verdrängt.

I.3.4. Transduktionstest B : Sonderstellung von pSR120

Bereits in der Transferversuchen (I.2.1.) wurde deutlich, daß pSR120 andere Wechselwirkungen mit RP4 ausübt als pSR100. Als Rezipienten-Plasmid vermindert pSR120 die Transferfrequenz von RP4-2 drastisch.

In Transduktionstests zeigte es sich, daß pSR120 die Aufnahme von RP4-2-Tc::Mu vollständig verhindert. Daher konnte nur eine Transduktionsrichtung getestet werden, nämlich die mit pSR120 als Donorplasmid (Tab.6).

Von der Primärselektionsplatte wurden vier Einzelkolonien nachgetestet. Dabei ergaben sich vier prinzipiell verschiedene Ergebnisse :

1) In der ersten Einzelkolonie wurde ein Rezipienten-Plasmid-Verdrängungsfaktor von 10^{-4} gefunden. Dieser Wert liegt deutlich über dem der Tabellen 4 und 5, d.h. pSR120 verdrängt das Rezipienten-Plasmid 10^3 - 10^4 fach schlechter als RP4-Mutanten.

2) In der zweiten Einzelkolonie waren alle getesteten Zellen $Ap^S Km^r Tc^r$. Im Plasmid-Nachtest im Agarosegel

Donor-Plasmid	Rez.-Plasmid	Sel. Medium	Einzelkolonie	Rez.-Plasmid Verdrängung	Bemerkung
pSR120	RP4-2-Tc::Mu	Tc	1 ●	10 ⁻⁴	relativ schwache Verdrängung
			1 ●	-	100% Ap ^S Km ^I Tc ^I / Gel: RP4-2 (Rekombination)
			1 ●	-	100% Ap ^I Km ^I Tc ^I / Gel: pSR120 (RP4-2-Tc::Mu integriert)
			1 .	-	10 ⁻² Verlust von Ap ^I Tc ^I / Gel: RP4-2-Tc::Mu + pSR100

Tab. 6 : Transduktion 8 : Wechselwirkungen zwischen pSR120 (Donor-Plasmid) und RP4-2-Tc::Mu (Rezipienten-Plasmid)

Nach Primärselektion auf das Donor-Plasmid (Tc) wurden vier Einzelkolonien untersucht : 3 normal große ● , 1 sehr kleine ● . Die Nachtests werden in D.I.3.4. erläutert.

Die Plasmidanalyse im Agarosegel wurde nach der in C.II.4.2. beschriebenen Methode durchgeführt.

wurde ein Plasmid von RP4-Länge gefunden. Es könnte also trotz der Rec^- Eigenschaft des Rezipienten eine Rekombination zwischen pSR120 und RP4-2-Tc::Mu stattgefunden haben mit dem Ergebnis, daß die Region "Tc::Mu" durch ein intaktes Tc-Resistenzgen ersetzt wurde.

3) Die Zellen der dritten Einzelkolonie waren in allen getesteten Fällen $\text{Ap}^{\text{r}}\text{Km}^{\text{r}}\text{Tc}^{\text{r}}$. Der Plasmidtest im Agarosegel ließ nur pSR120 erkennen. Weitere Nachtests zeigten, daß in diesem Stamm RP4-2-Tc::Mu im Chromosom integriert vorlag.

4) Die vierte Kolonie war deutlich kleiner als die drei vorherigen. Hier wurde ein Verlust der Marker des Donor-Plasmids (ApTc) festgestellt (trotz Donor-Plasmid Selektion auf Tc). Der Agarosegel-Nachtest dieser Kolonie zeigte die Anwesenheit von RP4-2-Tc::Mu und pSR100. pSR120 war nicht mehr nachweisbar.

Offenbar hat eine Umwandlung von pSR120 zu pSR100 (Verlust von ColE1) stattgefunden; pSR100 wurde dann von RP4-2-Tc::Mu verdrängt.

Die Wechselwirkungen zwischen pSR120 und RP4-2-Tc::Mu können wie folgt zusammengefaßt werden:

pSR120 verhindert die Etablierung von anderen RP4-Derivaten. Nach Transduktion von pSR120 zu RP4-2-Tc::Mu konnten in vier Einzelkolonien vier verschiedene Phänomene beobachtet werden;

1) die erwartete Verdrängung von RP4-2-Tc::Mu durch pSR120 (jedoch deutlich schwächer als durch andere RP4-Mutanten).

2) Rekombination zwischen RP4-2-Tc::Mu und pSR120 (trotz der Rec -Mutation des Rezipienten).

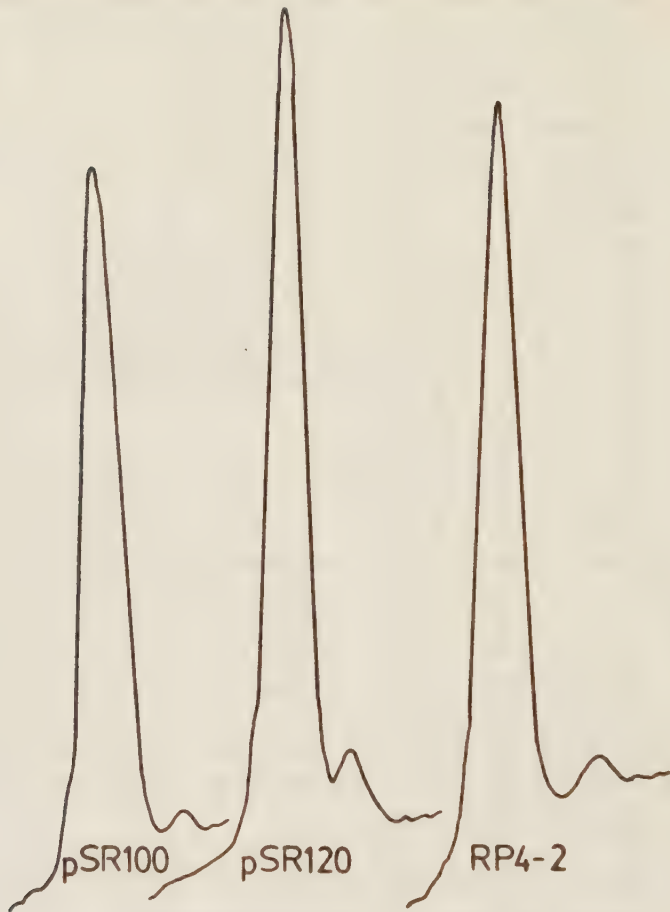


Abb. 4 : Kopienzahlbestimmung von
RP4-Derivaten

Sarkosyl-Lysate von Stämmen mit den gezeigten Plasmiden wurden in analytischen CsCl-Gradienten aufgetrennt. Der große peak der Dichteprofile entspricht der chromosomalen, der kleine peak der Plasmid-DNA.

Aus den Flächenverhältnissen lassen sich die in der Tabelle angegebenen Werte für die Plasmid-Kopienzahl pro Chromosom berechnen.

Plasmid	Kopien pro Chromosom
pSR100	3,6
pSR120	10,6
RP4-2	4,7

- 3) Integration von RP4-2-Tc::Mu ins Chromosom, dann stabile Vererbung von pSR120.
- 4) Rekonstruktion von pSR100 aus pSR120 mit anschließender Verdrängung von pSR100 durch RP4-2-Tc::Mu.

Da pSR120 bezüglich der RP4-spezifischen Sequenzen mit pSR100 identisch ist, müssen die veränderten Eigenschaften eine Funktion des zusätzlichen ColE1-Replikons sein. Denkbar wäre eine Erhöhung der Kopienzahl, wenn sich ColE1 auf die Replikation von pSR120 auswirken würde.

Diese Möglichkeit wurde durch analytische Dichtegradientenzentrifugation geprüft.

Abb.4 zeigt das Ergebnis dieser Analysen. pSR120 weist eine 2-3 fach höhere Kopienzahl auf als pSR100 oder RP4-2. Auf dieser Basis könnten die beobachteten Phänomene diskutiert werden. In E.I.7. werden hierzu einige Modellvorstellungen entwickelt.

I.3.5. Transduktionstest C :

Verhalten von pSR100 nach Transduktion zu RP4-2-Tc::Mu

Wie die vorhergehenden Versuche wurden auch diese Inkompatibilitätstests nach dem allgemeinen Schema der Abb.3 durchgeführt.

Dabei ergaben sich einige besondere Aspekte, die anhand eines erweiterten Versuchsschemas in Abb.5 diskutiert werden.

Die Transduktion bereitete keine Schwierigkeiten, RP4 verhindert nicht die Etablierung von pSR100 (Abb.5/1).

Bei der Tc-Primärselektion auf das Donorplasmid pSR100 fiel jedoch auf (Abb.5/2), daß die überwiegende Anzahl der Kolonien wesentlich langsamer wuchs, als in

in Experimenten mit anderen Donor-Plasmiden.

Die Kolonien waren klein und unregelmäßig geformt; normale große, runde Kolonien waren relativ selten zu finden. Im anschließenden Nachtest wurden daher große und kleine Einzelkolonien getrennt untersucht (Abb.5/3). Zwei große Einzelkolonien der Primärselektion wurden getestet. Die Analyse zeigte, daß sie nur ein Plasmid enthielten, das die Marker $Km^R Tc^R$ trug und die Größe von RP4 aufwies. Vermutlich waren hier Rekombinationen zwischen RP4-2-Tc;Mu und pSR100 aufgetreten.

Bei den meisten kleinen Einzelkolonien waren die Titerzahlen auf allen drei Platten des Nachtests I annähernd gleich groß (Abb.5/3a). Die Verdrängung des Rezipienten-Plasmids RP4-2-Tc;Mu war somit nicht eindeutig nachweisbar. Damit wurde Nachtest II wichtig. Hier wurden die Kolonien der Titerplatten aus Nachtest I parallel auf die Selektionsmedien Km (Rezipienten-Plasmid) und Tc (Donor-Plasmid) übertragen. Getestet wurden meist 50 Kolonien oder wenn nötig über 1000.

Für einen ersten Überblick sind folgende Beobachtungen von Bedeutung :

- Auf den Titerplatten PA und PAKm wuchsen nur normal große Kolonien (Abb.5/3a).
- Die Kolonien der PA-Titerplatte waren entweder Tc^R oder Km^R . Doppelresistenzen wurden nicht gefunden. Das könnte bedeuten, daß die kleinen Kolonien der Primärselektion Mischpopulationen sind, deren Zusammensetzung nach Entfernung des Selektionsdruckes deutlich wird. Genaue Prozentsätze der Km^R/Tc^R Verteilung dieser Kolonien werden anhand der Tab.7 diskutiert.
- Die Kolonien der Km-Platten waren alle zu 100% $Km^R Tc^S$,

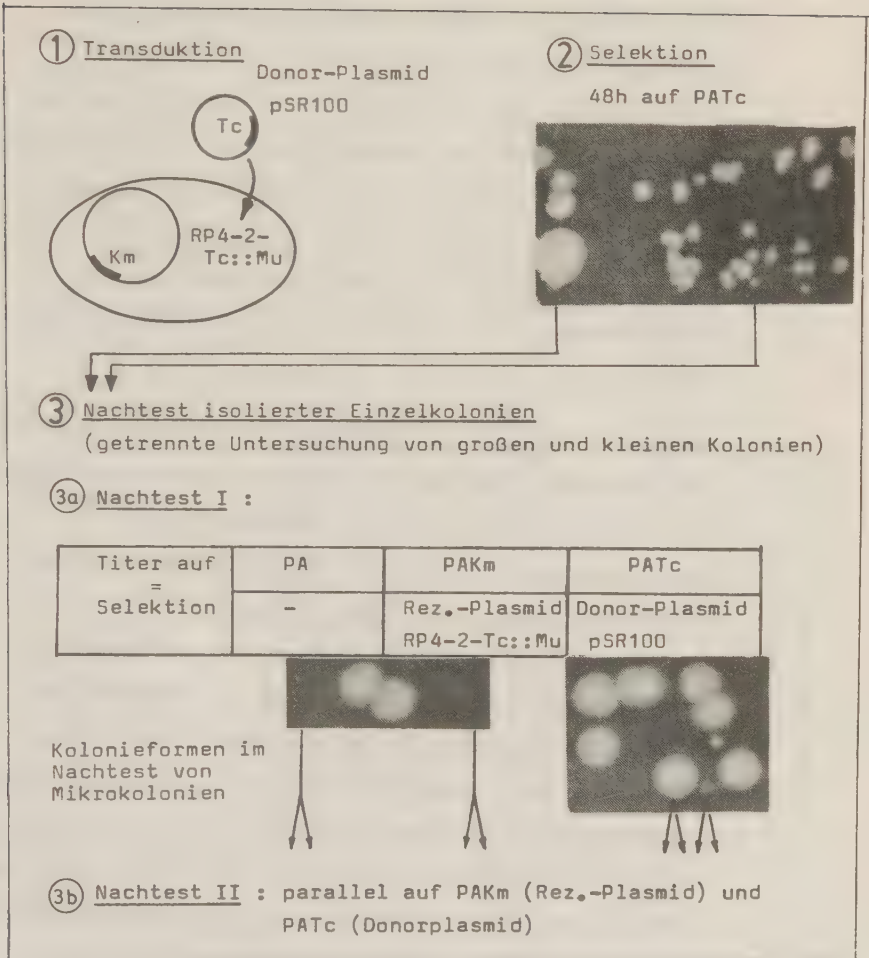


Abb. 5 : Transduktion C :

Wechselwirkungen zwischen pSR100 (Donor-Plasmid) und RP4-2-Tc::Mu (Rezipienten-Plasmid)

Die Abbildung zeigt den schematisierten Versuchsablauf (Vgl. Abb.3) sowie die Kolonieformen, die bei der ersten Selektion (Pkt.2) und beim Nachtest von Mikrokolonien (Pkt.3a) gefunden wurden.

Die Ergebnisse sind in D.I.3.5. beschrieben (Vgl. Tab. 7 u.8)

d.h. nach Primärselektion auf Tc (Donor-Plasmid) und Sekundärselektion auf Km (Rezipienten-Plasmid) erscheinen wieder rein Km^r Zellen.

- Die Kolonien der Tc-Platten (hier wurde in zwei aufeinander folgenden Wachstumszyklen auf das Donor-Plasmid selektioniert) zeigten wieder eine Aufspaltung in große und kleine Einzelkolonien (Abb.5/3a). Die Zusammensetzung dieser zweimal auf Tc gewachsenen Einzelkolonien wird anhand von Tab.8 ausführlich dargestellt.

Genauere Untersuchungen befaßten sich nun mit der Frage der Zusammensetzung der Mikrokolonien der Primärselektion. Die Ergebnisse sind in Tab.7 zusammengefaßt.

Um den Gesamtzusammenhang zu verdeutlichen, sei noch einmal auf Abb.5 Punkt 1 und 2 hingewiesen :

pSR100 wurde mittels Transduktion mit RP4-2-Tc::Mu zusammengebracht. Anschließend wurde auf Tc-Medium auf pSR100 selektioniert. 15 verschiedene Mikrokolonien wurden dann auf Anwesenheit von Donor- und Rezipienten-Plasmid untersucht. Sie wurden auf PA getitert, d.h. der Selektionsdruck wurde entfernt. Danach wurde durch Überstempeln auf Km und Tc die prozentuale Zusammensetzung der ursprünglichen Kolonie festgestellt.

Der Anteil von Km^r Zellen lag zwischen 2 und fast 100%, wobei 10 Kolonien noch über 50% Km^r Zellen enthielten. Der Anteil der Tc^r Zellen lag zwischen ca. 0,05% und 98%. Doppelresistenzen wurden nicht gefunden.

Diese Ergebnisse stehen in deutlichem Gegensatz zu den bisherigen Inkompatibilitätsversuchen (Vgl. Tab.4 und 5). Das Rezipienten-Plasmid war hier trotz Donor-Plasmid-Selektion noch im Prozentbereich auffindbar; in den

Transduktion		Sel. Medium	Kolonien	Titer auf PA Nachttest parallel auf	
Donor-Plasmid	Rez.-Plasmid			Km	Tc
pSR100 (Tc)	RP4-2-Tc::Mu (Km)	Tc	15	Rez.-Plasmid 2 - ca. 100 % 10 Kol. > 50 % 5 Kol. < 50 %	Donor-Plasmid 98 - ca. 0,05 %

Tab. 7 : Transduktion C (pSR100 $\rightarrow$ RP4-2-Tc::Mu) Nachttest I :

Nach Primärselektion auf das Donor-Plasmid (Tc) wurden Zellen aus 15 Mikrokolonien auf PA gewachsen und auf ihren Plasmidgehalt durch Übertragung auf Km- bzw. Tc-Medium getestet (vgl. Abb. 5 Pkt. 3a).

Die Prozentzahlen streuen in dem in der Tabelle angegebenen Bereich.

Transduktion		Selektion	• Einzelkolonie getitert auf			
Donor-Plasmid	Rez.-Plasmid		PA ●	Km ●	Tc ●	Tc ●
pSR100 (Tc)	RP4-2-Tc::Mu (Km)	2x auf Tc	10 ⁴	10 ⁴	2x10 ²	10 ³

Tab. 8 : Transduktion C (pSR100 $\rightarrow$ RP4-2-Tc::Mu) Nachttest II :

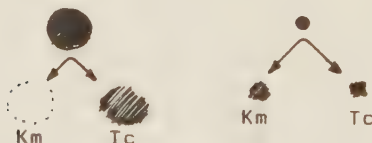
Eine Mikrokolonie wurde nach zwei Selektionszyklen auf Tc (pSR100) auf den angegebenen Medien getitert. Die gefundenen Werte zeigen, daß in den meisten Zellen einer Mikrokolonie beide Plasmide repliziert wurden. Die Kreise symbolisieren die Größe der Kolonien der Titerplatten.

meisten Einzelkolonien sogar über 50%.

Das bedeutet, daß unter Tc-Selektionsdruck das Rezipienten-Plasmid RP4-2-Tc^r Mu über lange Zeit in Tc^r, also pSR100 haltigen Zellen, vermehrt wurde; oder mit anderen Worten, daß pSR100 nicht in der Lage ist, RP4-2-Tc^r Mu wirkungsvoll zu verdrängen.

In Abb.5 Punkt 3a wurde gezeigt, daß die Mikrokolonien der primären Tc-Selektion bei erneuter Inkubation auf Tc-Medium (= zweite Selektion auf das Donorplasmid pSR100) in große und kleine Kolonien aufspalten. Diese wurden im Nachtest II (Abb.5/3b) getrennt weiteruntersucht.

Ein Stempeltest liefert folgendes schematisierte Bild:



Das bedeutet, daß in den großen Einzelkolonien eine endgültige Verdrängung des Rezipienten-Plasmids (RP4-2-Tc^r Mu, Km^r) stattgefunden hat. Die Kolonien sind eindeutig Km^S.

Die kleinen Einzelkolonien bilden annähernd gleich starke Kolonie-Abdrücke auf Km- und Tc-Medium. Dies ist nicht eine Folge stabiler Anwesenheit beider Km^r und Tc^r in allen Zellen dieser Kolonien, wie in Tab.8 gezeigt wird. Kleine Einzelkolonien wurden wieder in Puffer suspendiert, verdünnt und getitert. Unter 10^4 getesteten Zellen waren fast alle Km^r. Auf der Tc-Titerplatte fanden sich 2×10^2 große und 10^3 kleine Tc^r Kolonien.

Alle Titerplatten wurden weitergestempelt. Weder auf der PA- noch auf der Km-Platte fanden sich Tc^r Zellen, d.h.

auch nach zwei Selektionszyklen auf das Donorplasmid ist dieses wieder vom Rezipienten-Plasmid verdrängbar, sobald der Selektionsdruck entfernt wird.

75% der großen Kolonie der Tc-Titerplatte zeigten immer noch eine gemischte Zusammensetzung aus Km^R und Tc^R Zellen; nur 25% haben das Rezipientenplasmid endgültig segregiert (= $Tc^R Km^S$).

Die kleinen Kolonien zeigten wieder das Phänomen, im Stempeltest 100% $Km^R Tc^R$ zu sein. Weitere Tests bewiesen allerdings auch hier eine fortgesetzte Aufspaltung in rein Km^R und rein Tc^R Zellen.

Die Untersuchungen der Mikrokolonien, die nach Transduktion von pSR100 zu RP4-2-Tc μ und Selektion auf Tc (pSR100) auftraten, erbrachten zusammenfassend folgendes Ergebnis. pSR100 kann RP4-2-Tc μ nicht effektiv verdrängen. Ein hoher Anteil der Zellen vermehrt offenbar pSR100 und RP4-2-Tc μ gleichzeitig. Solche Zellen wachsen sehr langsam, sie bilden kleine und unregelmäßig geformte Kolonien.

Im nächsten Abschnitt wird die Morphologie dieser Bakterienzellen beschrieben.

I.3.6. Untersuchungen zur Zellmorphologie

In Kapitel I.3.5. war deutlich geworden, daß pSR100 und RP4-2-Tc μ über längere Zeit relativ stabil in einer Zelle etabliert werden können, wenn pSR100 das selektionierte Donorplasmid des Versuches ist. Zellen mit diesen zwei Plasmiden wachsen langsam, sie bilden bei normalen Inkubationszeiten Mikrokolonien. Nach Segregation eines der beiden Plasmide erscheinen wieder normal große Kolonien.

Die mikroskopische Kontrolle großer und kleiner Kolonien ist in Abb.6 gezeigt.

Untersucht wurden Kolonien aus einem Versuch, der nach dem Schema der Abb.5 durchgeführt wurde (Vgl. Abb.5 Punkt 3 und Tab.8). pSR100 wurde zu RP4-2-Tc; μ transduziert, Transduktanten wurden auf Tc selektioniert und eine Mikrokolonie wurde auf Tc gereinigt. Dabei kam es zur Aufspaltung in große und kleine Einzelkolonien. Große Kolonien dieses Versuchs ($Km^S Tc^R$ = pSR100) enthalten überwiegend normale Zellen. Vereinzelt findet man kleinere Filamente (Abb.6a). Ein Kontrollstamm mit RP4-2-Tra; μ zeigt ein ähnliches Bild (Abb.6b).

Mikrokolonien, die einen hohen Anteil an Zellen aufweisen, die pSR100 und RP4-2-Tc; μ besitzen, unterscheiden sich im mikroskopischen Bild deutlich von den großen Kolonien. Die Zellen sind deutlich dicker, es treten sehr viele verlängerte Zellen auf und man findet häufig lange Filamente (Abb.6c).

Man könnte annehmen, daß die großen Zellen den Anteil einer Mikrokolonie repräsentieren, die zwei RP4-Derivate enthalten und die dadurch auf bisher unerklärter Weise in ihrer Zellteilungsfähigkeit gestört sind.

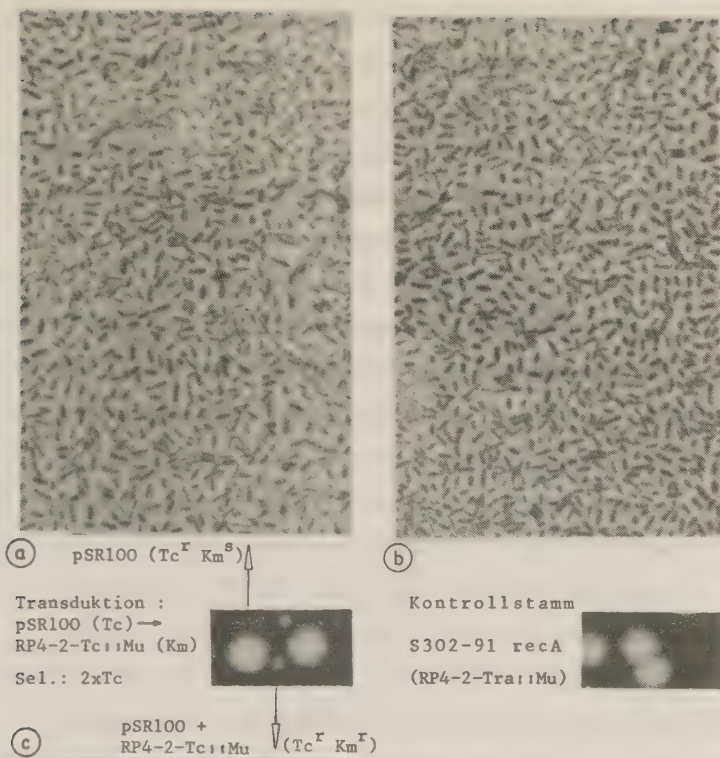


Abb. 5 : Mikroskopische Untersuchung von Einzelkolonien der Transduktion C (pSR100 $\rightarrow$ RP4-2-Tc::Mu)

Gemäß dem Schema der Abb. 5 wurden Mikrokolonien der Tc-Primärselektion erneut auf Tc angezogen. Die dabei auftretenden großen Kolonien besitzen nur noch das Donor-Plasmid pSR100 (6a), während die kleinen Kolonien einen hohen Anteil von Zellen mit Donor- und Rezipienten-Plasmid aufweisen. (6c).

Die Zellmorphologie wird in D.I.3.6. diskutiert.

I.4. Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit sollten transcomplementierbare Replikationsmutanten des RP4-Plasmids konstruiert und charakterisiert werden. Transcomplementation von mutierten RP4-Replikations-Genen sollte von anderen RP4-Plasmiden übernommen werden.

In Kapitel D.I. ist die Auswahl eines geeignet erscheinenden RP4-Plasmidsystems beschrieben. Außerdem wurden die Wechselwirkungen zwischen RP4-Derivaten studiert. Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen. Rec^+ Stämme erwiesen sich als völlig ungeeignet für die Untersuchungen, da RP4-Plasmide in diesen Stämmen mit hoher Frequenz rekombinieren und sich nicht als unabhängige Replikons vermehren lassen. Alle weiteren Tests wurden daher in Rec^- Rezipienten durchgeführt.

RP4-2 ($\text{Ap}^{\text{S}}\text{Km}^{\text{r}}\text{Tc}^{\text{r}}\text{Tra}^+$) wurde als das Plasmid ausgewählt, das mittels Mu-Mutagenese mutiert werden soll.

Als Transcomplementationspartner standen zwei RP4-Derivate zur Auswahl : pSR100 und pSR120.

pSR100 ist eine Deletionsmutante von RP4 (Verlust von Km^{r} und Tra). pSR120 ist bezüglich der RP4-spezifischen Sequenzen identisch mit pSR100, besitzt jedoch zusätzlich ein intaktes ColE1-Replikon, das in der EcoRI-Schnittstelle des Plasmids inseriert vorliegt.

Die ursprüngliche Annahme, daß die ColE1-Replikations-Einheit pSR120 in Gegenwart von RP4 stabilisieren und so eine problemlose Transcomplementation ermöglichen könnte, erwies sich als falsch. pSR120 reduziert die Aufnahmefrequenz von RP4 drastisch. Die starke Unverträglichkeit von pSR120 mit RP4 führt unter Selektionsdruck zu Phänomenen wie Rekombination der Plasmide (trotz Rec^-)

oder Integration von RP4 ins Chromosom.

Zudem zeigte es sich, daß pSR120 von RP4 effektiv mobilisiert wird.

pSR100 erwies sich in vieler Hinsicht als der geeignete Transcomplementationspartner.

pSR100 verhindert nicht die Aufnahme von RP4-Plasmiden und wird von diesen auch nicht mobilisiert.

Inkompatibilitätsreaktionen zwischen RP4-Derivaten und dem miniRP4 pSR100 sind stark asymmetrisch. RP4 verdrängt pSR100 mit sehr hoher Frequenz, dagegen ist pSR100 als Donor-Plasmid nicht in der Lage, RP4 wirksam zu verdrängen.

Unter Selektion auf pSR100 lassen sich Zellen isolieren, die pSR100 und ein anderes RP4-Plasmid enthalten. Solche Zellen wachsen sehr langsam. Sie sind möglicherweise in ihrer normalen Zellteilungsfähigkeit gestört, denn man kann sehr viele Zellfilamente in den Kolonien finden.

Im Hinblick auf den Hauptteil der Arbeit konnte vermutet werden, daß Replikations-defekte RP4-2 Mutanten unter Selektionsdruck auf RP4-2 genügend stabil etabliert werden können, um sie genetisch und molekularbiologisch charakterisieren zu können. Wie die Abb.7 verdeutlicht, sollten bei Selektion auf Km nur Zellen wachsen, die ein replikationsdefektes RP4-2 Plasmid und damit notwendigerweise auch pSR100 als Transcomplementationspartner enthalten.

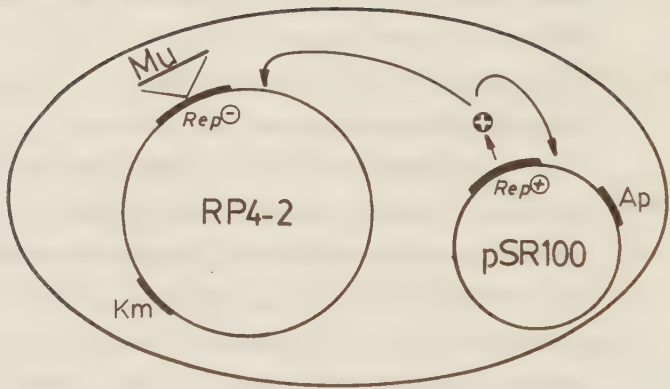


Abb. 7 : Schema eines möglichen Transcomplementations-
systems von RP4-Derivaten

Die Abbildung beinhaltet folgendes Arbeitsmodell:

Ein RP4-Replikationsgen (Rep) codiert für ein Gen-
produkt, das die Plasmidreplikation steuert. Dies
könnte z.B. ein Aktivatorprotein sein.

Wird RP4-2 zu Rep⁻ mutiert (Mu-Insertion), müßte das
Rep-Genprodukt durch Transcomplementation von pSR100
zur Verfügung gestellt werden.

Nach den Ergebnissen des Kapitels D.I. scheint es
möglich zu sein, pSR100 und RP4-2-Mutanten in einer
Zelle zu etablieren.

D.II. Konstruktion von Replikations-defekten RP4-2 Mutanten

II.1. Erläuterung des Versuchsschemas der Mu-Mutagenese

Das Grundkonzept der Mu-Mutagenese zur Erzeugung Replikations-defekter RP4-2 Mutanten wurde bereits in Abb.1 erläutert. Im folgenden Abschnitt soll anhand einer ausführlicheren Schemazeichnung (Abb.8) das Versuchsprinzip noch einmal dargestellt werden. Experimentelle Einzelheiten hierzu werden in Abschnitt D.II.2. behandelt.

Abb.8 Punkt 1 : Mu-Infektion

Ein Lysat des Phagen Mu_c^+ (= Wildtyp Mu) wird zu einer logarithmisch wachsenden Kultur des Mu-sensitiven Stammes S291-2 (RP4-2) gegeben. Aus der Biologie des Mu-Phagen ist bekannt, daß dieser sein Genom nach Infektion einer Bakterienzelle an beliebigen Stellen der Wirts-DNA inserieren kann. Für die anschließenden Experimente geht man davon aus, daß die Mu-Insertion in ein Gen des RP4-2 Plasmides stattgefunden haben könnte, das für ein Replikationsprotein codiert. Ein so mutiertes Plasmid würde nicht lange überleben, da nach Ausverdünnen der entsprechenden Genprodukte keine neue Replikation mehr möglich wäre. Im nächsten Schritt muß daher Transcomplementation des Defekts im Replikationssystem von RP4-2 ermöglicht werden.

Abb.8 Punkt 2 : Erste Kreuzung

Der Mu-infizierte Stamm wird als Donorkultur in einer Kreuzung verwendet, deren Rezipient pSR100 besitzt (S3032-111). pSR100 wird, wie in D.I.4. begründet wurde, als Transcomplementationspartner für mutierte RP4-2 Plasmide eingesetzt.

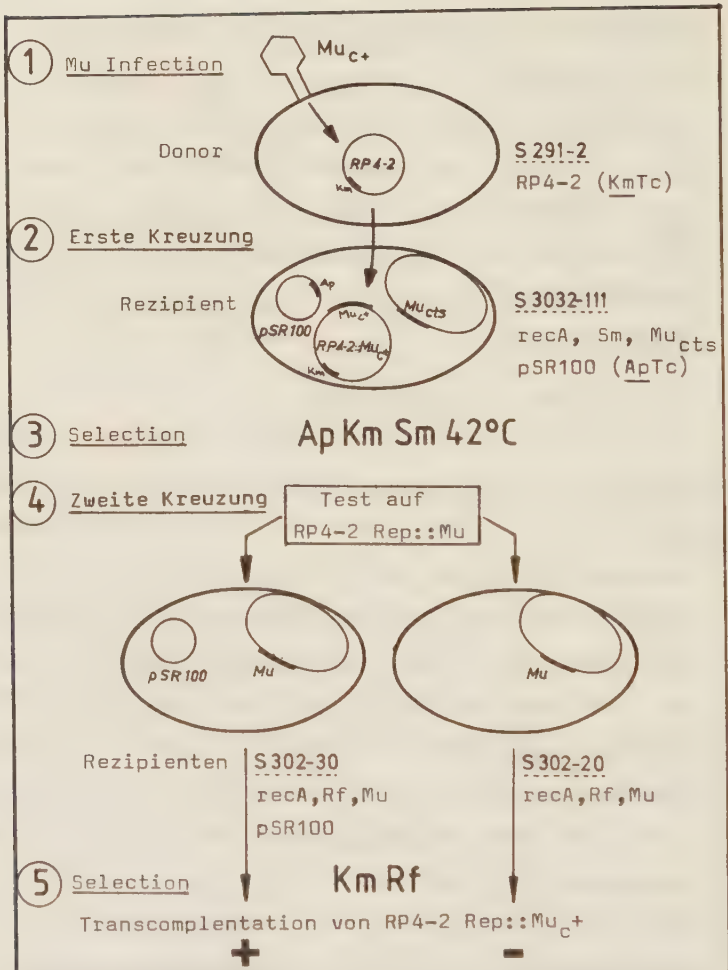


Abb. 8 : Versuchsprinzip der Konstruktion und
Identifizierung von Replikations-
defekten RP4-2 Mutanten

Die Abbildung zeigt die verwendeten Stämme und deren für den Versuch relevante Marker.

Die einzelnen Schritte des Experiments werden in D.II.1. diskutiert.

Abb.8 Punkt 3 : Selektion

Das Kreuzungsgemisch wird nach einer Vorinkubation auf ein Medium ausgespatelt, das die drei Antibiotika Ap, Km und Sm enthält und das bei 42°C inkubiert wird.

Diese Selektionsbedingungen haben folgenden Zweck:

- a) Mit Sm wird gegen den Donorstamm selektioniert.
- b) Km selektioniert allgemein auf RP4-2 in den Rezipienten.
- c) Da der Rezipientenstamm den hitzeinduzierbaren Mu_{cts} -Prophagen besitzt, würde er bei erhöhter Temperatur von diesem Phagen lysiert werden. Bei 42°C wachsen daher nur solche Transconjuganten, die ein RP4-2:: Mu_c + Hybridplasmid erhalten haben. Das zusätzliche Mu_c + Phagengenom im transferierten RP4-2 Plasmid stellt genügend hitzestabile Mu-Repressormoleküle zur Verfügung, um ein Überleben der Zellen zu ermöglichen. Inkubation bei 42°C garantiert also, daß nur Transconjuganten wachsen, die eine Mu_c + induzierte Mutante des RP4-2 Plasmids erhalten haben.

(Da der Rezipientenstamm S3032-111 Mu-resistent ist, kann Infektion von Mu_c + Phagen aus dem Medium weitgehend ausgeschlossen werden)

- d) Falls wirklich ein transcomplementierbares Replikationsdefektes RP4-2:: Mu_c + Hybridplasmid entstanden sein sollte, müßte bei Selektion auf Km und 42°C zwangsweise pSR100 in den Rezipienten mitvermehrt werden (trotz der in D.I.3. besprochenen Incompatibilität der Plasmide).

Dem Selektionsmedium wird nun zusätzlich Ap beigegeben, um möglicherweise genau solche Transconjuganten anzureichern, die RP4-2::Mu und pSR100 gleichzeitig enthalten.

(Auf die Einschränkung, daß Ap-Medium nicht unbedingt geeignet ist, aus Zellgemischen echt Ap^r -Zellen zu selektieren, sei noch einmal hingewiesen, vgl. D.I.2.2.)

Zusammenfassend kann man davon ausgehen, daß auf ApKmSm bei 42°C nur solche Rezipienten wachsen, die RP4-2::Mu_c+ Mutanten enthalten und daß die ApKm-Doppelresistenz ein Hinweis dafür sein könnte, daß die Transconjuganten neben RP4-2::Mu auch noch das ursprüngliche Rezipienten-Plasmid pSR100 behalten haben.

Im weiteren Verlauf des Experiments wird gezielt nach RP4-2-Rep::Mu Mutanten gesucht.

Abb.8 Punkt 4 : Weiterkreuzung

Transconjuganten der obigen Kreuzung werden nun ihrerseits als Donorkulturen verwendet. Sie werden parallel mit zwei verschiedenen Rezipienten weitergekreuzt.

S302-30 besitzt wieder pSR100 während S302-20 plasmid-frei ist. Beide Rezipienten sind Mu-lysogen, sodaß keine zygotische Induktion auftreten kann, wenn RP4-2::Mu transferiert wird.

Abb.8 Punkt 5 : Selektion

In der zweiten Kreuzung wird auf KmRf selektioniert.

Rf unterdrückt das Wachstum der Donorkolonien; Km selektioniert allgemein auf RP4-2 Transfer.

Die gesuchten RP4-2-Rep::Mu Plasmide können nur in S302-30 durch den dort anwesenden pSR100 transcomplementiert werden, nicht aber in S302-20. Ein Vergleich der Kreuzungsergebnisse mit den beiden Rezipienten erlaubt daher die Identifizierung von Donorkolonien, die Replikationsdefekte RP4-2 Mutanten enthalten.

Nachdem in Kap.D.II.1. und der Abb.8 das Prinzip der Suche nach RP4-2-Rep::Mu Mutanten erläutert wurde, sollen in den folgenden Kapiteln Einzelheiten der hierzu durchgeführten Experimente sowie deren Ergebnisse vorgestellt werden.

II.2. Ergebnisse der Mu-Mutagenese

Dieser Abschnitt behandelt den Versuchsablauf von der Mu-Infektion des Donorstammes bis zur Selektion der ersten Kreuzung (Vgl. Abb.8 Punkt 1-3).

Der erste Teil der Experimente, die Mu-Infektion eines RP4-2 tragenden Donorstammes und deren Auswirkungen, wird anhand von Abb.9 diskutiert.

S291-2 (RP4-2) wird durch langsames Rollern in die log-Phase angezogen. Starkes Schütteln der Kultur wird vermieden, um die RP4-2 Donoreigenschaften nicht zu beeinträchtigen.

Abb.9 Punkt 1 : Mu-Infektion

Bei einer optischen Dichte von 0,3 (ca. 2×10^8 cfu/ml) wird ein Teil der Kultur mit einem Mu-Lysat vermischt (m.o.i. 1), ein Teil bleibt zur Kontrolle unfiziert. Die Kulturen werden 15 min bei 37°C ruhig stehend inkubiert, um optimale Mu-Adsorption zu ermöglichen.

Abb.9 Punkt 2 : Erste Kreuzung

Aliquots der Mu-infizierten und der nicht-infizierten Donorkulturen werden mit logarithmisch wachsenden Rezipientenzellen (S3032-111) im Verhältnis ca. 1:10 gemischt. Die Kreuzungsgemische werden durch vorsichtiges Zentrifugieren eingeengt und auf Filter aufgebracht, die auf vorgewärmten RGM-Platten liegen.

Abb.9 Punkt 3 : o.D. Kontrolle der Donorkultur

Um die Auswirkungen der Mu-Infektion kontrollieren zu können, werden die Donorkulturen (Mu-infiziert und Mu-frei) ohne Zugabe von Rezipienten unter guter Belüftung weiterinkubiert. Die o.D.-Kurven zeigen, daß beide Kulturen zunächst gleich schnell weiterwachsen.

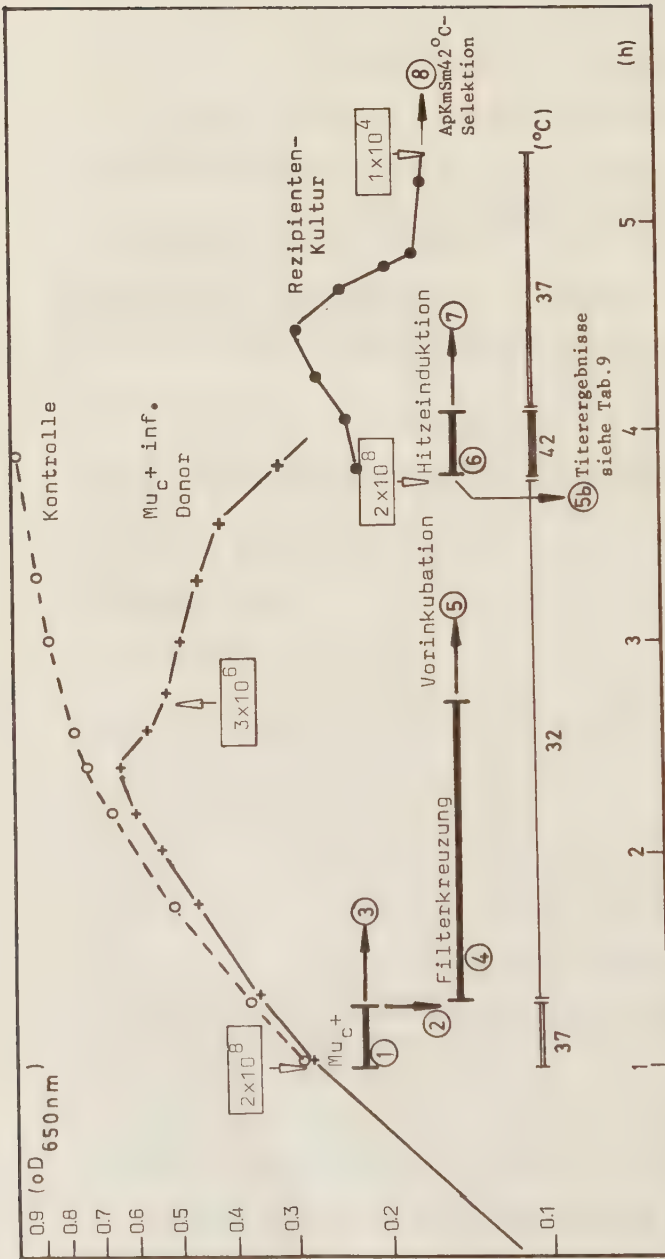


Abb. 9 : Ergebnisse der Mu-Mutagenese (1) : Verlauf der optischen Dichte der Kulturen

Anhand der o.D. Kurven wird der erste Teil der Konstruktion von RP4-2-Rep1, Mu in D.II.2. beschrieben. Die Abbildung enthält neben den Absorptionseinheiten (oD650nm) und den Stunden (h) die Inkubationstemperaturen der einzelnen Versuchsabschnitte.

Abb.9 Punkt 4 : Filterkreuzung

Diese Kreuzungsmethode gewährleistet optimalen RP4-2 Transfer. Die Inkubationstemperatur beträgt 32°C, um Mu_{cts}-Hitzeinduktion der Rezipientenzellen zu vermeiden. Wenn die Mu-infizierte Donorkultur zu lysieren beginnt (nach ca. 90 min; angezeigt durch Abfallen der optischen Dichte der Kontrollkulturen), wird die Kreuzung abgebrochen. Zu diesem Zeitpunkt befinden sich nur noch 3×10^6 Überlebende der Mu-Infektion in der Donorkultur. Die Filterplättchen werden in 10 ml RGnCSm-Medium stark geschüttelt, um die Bakterien zu suspendieren.

Abb.9 Punkt 5 : Vorinkubation

Nach Abzentrifugieren und Resuspendieren im gleichen Medium (Sm soll das Wachstum Überlebender Donorzellen verhindern) werden die Kulturen bei 32°C weitergewachsen. Während dieser Vorinkubation haben die Mu_c+ Phagen, die mit den RP4-2::Mu_c+ Hybridplasmiden in die Rezipienten gekommen sind, Gelegenheit, genügend thermostabile Mu-Repressoren zu bilden. Die Transdominanz dieser Mu_c+ Repressoren über die hitzelabilen Mu_{cts} Repressoren des Rezipienten wird im nächsten Schritt zur Selektion von RP4-2::Mu_c+ Transconjuganten ausgenutzt.

Abb.9 Punkt 5b: Titer des Vorinkubationsansatzes

Aus den Kulturen werden Proben entnommen und auf verschiedenen Medien getitert, um die Ergebnisse der ersten Kreuzungen dokumentieren zu können (siehe Tab.9).

Abb.9 Punkt 6 : Start der Hitzeinduktion

Die Kulturen der Vorinkubation werden abzentrifugiert und im doppelten Volumen vorgewärmten (42°C) Mediums resuspendiert. Zu diesem Zeitpunkt befinden sich ca. 2×10^8 Rezipientenzellen pro ml in den Suspensionen.

Die 42°C-Hitzebehandlung wird über 15 min bei guter Belüftung weitergeführt.

Abb.9 Punkt 7 : Mu_{cts} Phagenentwicklung

Bei der anschließenden Inkubation bei 37°C lysieren die induzierten Mu_{cts} Prophagen den größten Teil der Rezipientenkultur. Dies wird verdeutlicht durch den drastischen Abfall der optischen Dichte der Kultur und die Lebendtitrierbestimmung am Ende der Lyse (10^4).

Abb.9 Punkt 8 : Selektion

Den Abschluß dieses Versuchsteils bildet die in Abb.8 Pkt.3 erwähnte Selektion auf ApKmSm bei 42°C. Kolonien von diesen Selektionsplatten werden auf RP4-2-Rep;Mu weiteruntersucht (siehe Kap. D.II.3.).

In Abb.9 Pkt.5a wurde darauf hingewiesen, daß das Vorinkubationsgemisch kurz vor der Hitzeinduktion getitert wurde. Tab.9 faßt diese Ergebnisse zusammen. Die Kreuzungen wurden mit A und B bezeichnet. In A wurde der Mu-infizierte Donor verwendet, B ist die Mu-freie Kontrolle.

Tab.9 Test Nr. 1 : Sm 30°C :

Die Testkulturen waren entsprechend den Bedingungen der Hitzeinduktion vorher verdünnt worden. Der Gesamttiter der Rezipienten betrug dann $2-3 \times 10^8$ cfu/ml.

Tab.9 Test Nr. 2 : Sm 42°C :

42°C löst Hitzeinduktion des Mu_{cts} Prophagen im Rezipienten S3032-111 aus und vermindert dessen Lebendtitrier drastisch. Spontane Hitzeresistenz des Rezipienten wurde in diesem Test mit einer Frequenz von ca. 10^{-7} gefunden (2B).

Test Nr.	Medium	Temp. (°C)	Selektion von	cfu/ml	
				A (Donor+Mu)	B (Donor-Mu)
1	Sm	30	Gesamtiter der Rezipienten	2×10^8	3×10^8
2	Sm	42	Mu _{cts} Mutationen im Rezipienten oder RP4-2::Mu _c +Transfer	3×10^3	50
3	KmSm	30	Gesamtiter der Transconjuganten	2×10^6	2×10^6
4	KmSm	42	RP4-2::Mu _c + Transconjuganten	2×10^3	0

Tab. 9 : Ergebnisse der Mu-Mutagenese (2) :

Auswertung der ersten Kreuzungen

Nach Vorinkubation der Kreuzungsgemische A (Mu-infizierter Donor) und B (Mu-freie Kontrollkreuzung) wurden die in der Tabelle gezeigten Titerergebnisse erzielt.

Die einzelnen Werte sowie die daraus errechneten Transferfrequenzen werden in D.II.2. diskutiert.

In Kreuzung 2A findet man einen deutlich höheren Titer an 42°C -resistenten Rezipienten, was auf Transfer von RP4-2::Mu_c^+ hinweist.

Tab.9 Test Nr. 3 : KmSm 30°C :

Diese Selektion liefert den Gesamttiter der Transconjuganten. Damit lassen sich die Transferfrequenzen bestimmen. Nach Berücksichtigung aller Verdünnungsschritte des Experiments wurde mit einem ursprünglichen Donortiter von 2×10^7 cfu/ml gerechnet.

Die Transferfrequenz, definiert als Verhältnis von Transconjugantentiter zu Donortiter, beträgt in den beiden Kreuzungen 10%.

Mu-infizierte Donorzellen transferieren RP4-2 demnach ebenso gut wie Mu-freie Kontrollzellen.

Tab.9 Test Nr. 4 : KmSm 42°C :

Hier wird direkt auf RP4-2::Mu_c^+ selektioniert.

Die Berechnungen ergeben, daß unter 1000 Km^r RP4-2-Transconjuganten etwa 1 Rezipientenzelle ein RP4-2::Mu_c^+ Hybridplasmid erhalten hat.

Die Gesamtausbeute an Mu-induzierten RP4-2 Mutanten liegt in den vorgestellten Experimenten also bei etwa 10^4 (bei 10 ml Kultur).

Die in Abb.9 Pkt 6 u. 7 beschriebene Hitzeinduktion des Vorinkubationsgemisches dient zur Anreicherung dieser RP4-2 Mutanten aus dem 1000-fachen Überschuß an normalen RP4-2-Transconjuganten.

Nach der Hitzeinduktion wurde das Kreuzungsgemisch, wie mehrfach erwähnt, auf ApKmSm bei 42°C ausgespatelt.

Das folgende Kapitel beschreibt die Nachtests, die mit den daraus resultierenden Kolonien durchgeführt wurden.

II.3. Nachtest auf RP4-2-Rep⁺Mu Mutanten

Anhand der Erläuterungen zu Abb.8 wurde in Kap.D.II.1. im einzelnen die theoretische Bedeutung der 4-fach Selektion ApKmSm42⁰C abgehandelt. Berücksichtigt man nun noch die Ergebnisse der Tab.9, kann mit Sicherheit gesagt werden, daß hier nur Transconjuganten mit RP4-2::Mu_c⁺ Mutanten wachsen; spontane Km⁺42⁰C Resistenz tritt nicht auf.

Zunächst wurde weiter angenommen, daß Ap im Medium der Primärselektion auf die Anwesenheit von pSR100 hindeuten könnte.

Abb.10 zeigt das typische Bild einer solchen ApKmSm42⁰C-Selektionsplatte. Es fällt auf, daß etwa 10% der Kolonien deutlich kleiner sind als normale E.coli Kolonien. Zwei Beispiele dafür sind in der Abbildung markiert. Ähnliche Mikrokolonien wurden auch bei den Inkompatibilitätsuntersuchungen gefunden (D.I.3.5.). Die Aufgabe lautete nun, unter den RP4-2 Mutanten solche zu finden, die auf die ständige Anwesenheit von pSR100 angewiesen sind, d.h. deren Defekt im Replikationssystem von pSR100 transcomplementiert werden muß.

II.3.1. Experimentelle Einzelheiten des Nachtests

In Abb.8 wurde eine Übersicht über den Gesamtablauf der Konstruktion von RP4-2-Rep-Mutanten gegeben.

Abb.11 soll dazu dienen, Einzelheiten der gezielten Suche nach Replikations-defekten RP4-2 Mutanten im Anschluß an die Primärselektion (ApKmSm42⁰C) zu erläutern.

Um möglichst viele Kolonien untersuchen zu können, wurden alle folgenden Tests durch Überstempeln durchgeführt. Hierzu wurden von der Primärselektions-



Abb. 10 : Ergebnisse der Mu-Mutagenese (3) :

Selektionsplatte ApKmSm 42°C

Nach Mu-Infektion eines RP4-2 (Km) Donorstammes, dessen Kreuzung mit einem pSR100 (Ap) haltigen, Sm^r Rezipientenstamm und Selektion auf ApKmSm bei 42°C wurden häufig neben normal großen Kolonien sog. Mikrokolonien gefunden.

2 Beispiele sind in der Abbildung markiert.

Der Nachtest der Kolonien auf RP4-2-Rep::Mu Plasmide wird in D.II.3.2. und D.II.3.5. beschrieben.

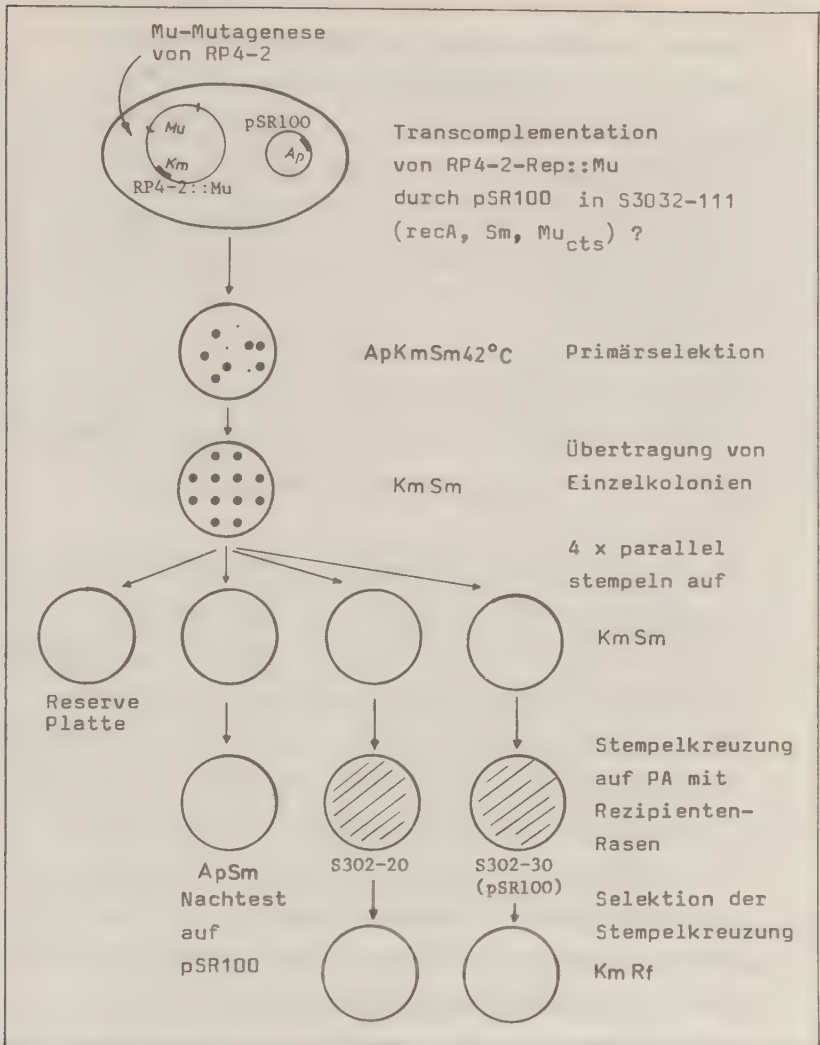


Abb. 11 : Nachtest auf RP4-2-Rep::Mu Mutanten (1) :

Schema des Versuchsablaufes

RP4-2 wurde durch Mu-Insertion mutagenisiert und in einen pSR100 haltigen Rezipienten transferiert (vgl. Abb.8 Pkt.1-3). Nach Primärselektion auf ApKmSm42°C (vgl. Abb.10) wurden die Kolonien nach dem hier gezeigten Schema nachgetestet. Experimentelle Einzelheiten des Nachtests sind in D.II.3.1. erläutert.

platte Einzelkolonien in geordneter Weise (20 oder 50) auf eine Ausgangsplatte übertragen.

Da mit diesen Kolonien mehrere Tests durchgeführt werden sollten, wird die Ausgangsplatte mindestens 4 mal parallel wieder auf KmSm überstempelt (Abb.11). Eine dieser Platte dient zur Aufbewahrung der untersuchten Stämme.

Die zweite der neuen Ausgangsplatten wird auf ApSm-Medium überstempelt. Hier kann festgestellt werden, ob nach Primärselektion auf ApKmSm und zwei Wachstumszyklen auf KmSm der Marker Ap^r (von pSR100) noch stabil vorliegt.

Mit den restlichen zwei Platten werden sog. Stempelkreuzungen durchgeführt. Der Sinn dieser Weiterkreuzungen wurde bereits mehrfach erläutert (vgl. Abb.8/4). Es wird hier gezielt nach solchen Kolonien gesucht, die ihr RP4-2::Mu Plasmid nur in Rezipienten mit pSR100 transferieren können, d.h. nach RP4-2-Rep::Mu Mutanten, die auf Transcomplementation durch pSR100 angewiesen sind.

Die Rezipienten der Stempelkreuzungen sind S302-20 und S302-30 (pSR100). Von diesen Stämmen werden je 10^9 oder mehr Zellen durch gleichmäßiges Ausgießen auf zwei relativ alte PA-Platten verteilt. Nachdem die Bakterien-suspensionen eingetrocknet sind, werden auf die so vorbereiteten Kreuzungsplatten die Donorkolonien aufgestempelt. Nach 6-12 Stunden, wenn auf dem bis dahin sichtbaren Rezipienten-Rasen auch die Donorkolonien schwach erkennbar sind, werden die Kreuzungsplatten auf Selektiv-Medium (KmRf) überstempelt.

Damit wird das Wachstum von Rezipienten-Rasen und Donorkolonien unterbunden und nur Transconjuganten

können weiterwachsen.

Die Selektionsplatten werden nach ca. 48-stündiger Inkubation mit den Donorplatten (bzw. der KmSm-Reserve-Platte) verglichen. Damit können leicht solche Donorkolonien identifiziert werden, die in der Lage waren, ihr Plasmid in die neuen Rezipienten zu übertragen. Ein Vergleich der Transconjuganten-Platten (S302-20/S302-30) untereinander zeigt, ob es Donorkolonien gibt, die ihr Plasmid nur nach S302-30 (pSR100), nicht aber in den Plasmid-freien Rezipienten S302-20 transferieren.

Solche Kolonien sollten die gesuchten RP4-2-Rep::Mu Mutanten enthalten. Genau diese Ausgangskolonien sollten auch stabil Ap^R sein, da Replikations-defekte RP4-2 Plasmide nur in Gegenwart von pSR100 repliziert werden können.

Gemäß dem Schema der Abb.11 wurden nun die Einzelkolonien untersucht, die nach Mu-Mutagenese und Primärselektion auf $ApKmSm42^OC$ erhalten wurden.

II.3.2. Nachtest zufällig ausgewählter Einzelkolonien

Um einen ersten Überblick zu gewinnen, wurden zufällig verteilte Einzelkolonien nachgetestet, d.h. es wurde nicht nach großen und kleinen Einzelkolonien unterschieden (vgl. Abb.10).

In Abb.12 ist ein Beispiel einer solchen Testserie gezeigt.

In diesem Experiment wurden folgende Ergebnisse erzielt:

a) von 50 getesteten Km^R Transconjuganten-Kolonien der ersten Kreuzung mit Mu-mutagenisierten RP4-2 Plasmiden erwiesen sich nur 4 als stabil Ap^R .

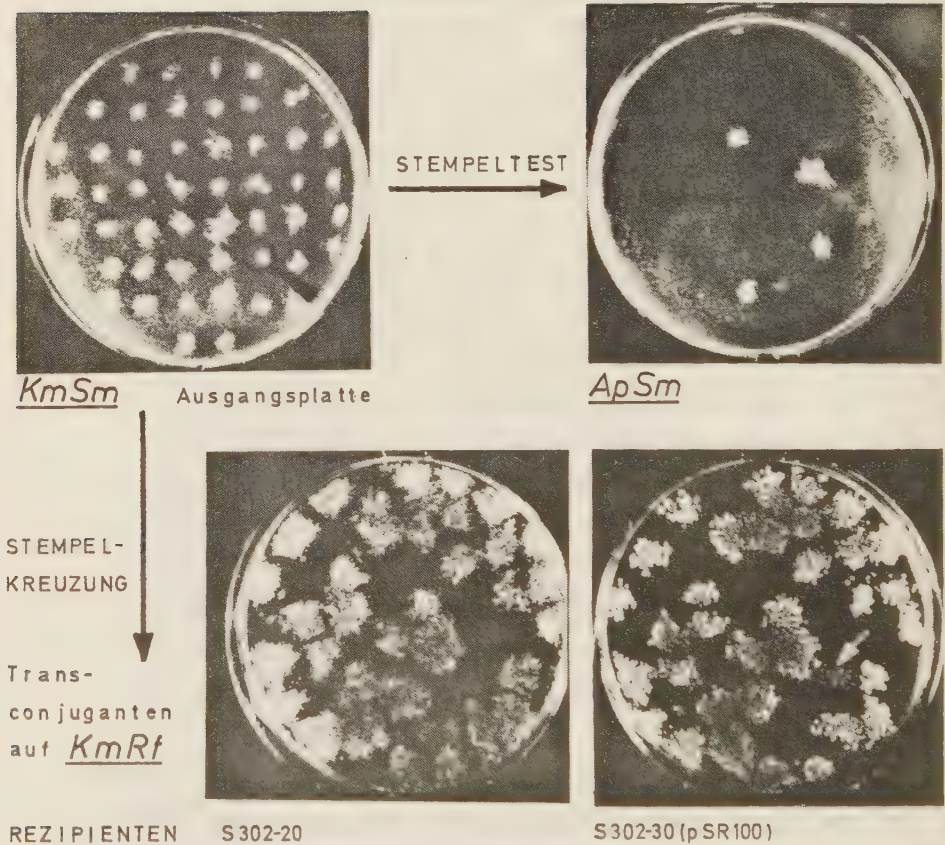


Abb. 12 : Nachtest auf RP4-2-Rep::Mu Mutanten (3) :

Nachtest von zufällig ausgewählten Einzelkolonien der $\text{ApKmSm42}^{\text{D}}\text{C}$ -Primärselektion

Die Stempeltests wurden nach dem in Abb. 11 gezeigten Schema durchgeführt. Die Ergebnisse werden in D.II.3.2. diskutiert.

Die restlichen Kolonien haben das ursprünglich vorhandene Plasmid pSR100 verloren.

b) Der weitere Transfertest mit dem Rezipienten S302-20 zeigt, daß von den 50 Donorkolonien 16 nicht mehr in der Lage sind, ihr Plasmid weiterzutransferieren.

Dies erkennt man an den Kolonie-freien Stellen der Selektionsplatten des Stempelkreuzungstests.

Die einfachste Erklärung hierfür wäre, daß durch die vorangegangene Mu-Mutagenese Tra^- Mutanten von RP4-2 erzeugt worden sind. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wird später diskutiert.

Erstaunlich ist, daß 3 von den 4 stabil Ap-resistenten Kolonien offenbar eine RP4-2-Mutante besitzen, die nicht mehr transferiert werden kann.

c) Beim Vergleich der beiden Selektionsplatten der Stempelkreuzung erkennt man eine Stelle, bei der nur mit S302-30(pSR100) Transconjuganten erscheinen. Diese Kolonie ist auf der Selektionsplatte markiert, ebenso die entsprechende Donorkolonie auf der Ausgangsplatte. Man erkennt außerdem, daß diese Kolonie auch stabil Ap^r ist.

Nach der bisher mehrmals erläuterten Theorie müßten die Zellen einer solchen Donorkolonie Replikationsdefekte RP4-2 Plasmide enthalten.

II.3.3. Zusammenfassung bisheriger Ergebnisse und Erweiterung des Versuchskonzepts.

In Abb.12 konnte gezeigt werden, daß mit dem theoretisch abgeleiteten Versuchskonzept tatsächlich das gewünschte Resultat, nämlich die Identifizierung einer Replikations-defekten Mutante von RP4-2, erzielt werden kann.

In dem experimentellen Ansatz, der in Kapitel D.II.2. beschrieben wurde, kann mit etwa 10^4 Mu-induzierten RP4-2 Mutanten gerechnet werden.

Das Problem war, aus diesen die gesuchten Rep-Mutanten herauszufinden. Beim Nachtest zufällig ausgewählter Einzelkolonien der ApKmSm42⁰C-Selektion wurde 1 unter 50 getesteten Kolonien gefunden.

Inkubation auf ApKm hat möglicherweise dazu beigetragen, solche Kolonien anzureichern, die beide Plasmide (RP4-2::Mu und pSR100) besitzen. Eine direkte Co-selektion (ApKm) auf stabile Vererbung von pSR100(Ap) in Gegenwart von RP4-2 (Km) war nach den Ergebnissen der Inkompatibilitätstests (vgl. D.I.2.2.) nicht zu erwarten und im Zusammenhang mit der Suche nach RP4-2-Rep Mutanten auch gar nicht erwünscht. Zellen mit Replikations-defekten RP4-2 Plasmiden müßten von sich aus gezwungen sein, bei Km-Selektion pSR100 mitzuvermehren.

Um diese Theorie zu beweisen, wurden auch Kolonien nachgetestet, die nach Mu-Mutagenese des RP4-2 Donors nur auf Km42⁰C selektioniert worden waren. Hierbei wurden ebenfalls RP4-2-Rep::Mu Plasmide gefunden, allerdings mit wesentlich niedrigerer Frequenz als nach Primärselektion auf ApKmSm42⁰C.

Die 4-fach Selektion erleichtert also die Suche nach Zellen mit zwei Plasmiden.

Für die weitere Suche nach Replikations-defekten RP4-2 Mutanten wurde das Versuchskonzept wie folgt erweitert:

a) Für die Stempelkreuzungstests wurden durch entsprechende Vortests von den Primärselektionsplatten nur solche Kolonien ausgewählt, die stabil Ap^r waren. Damit war nach den bisherigen Erkenntnissen eine Steigerung der Ausbeute an RP4-2-Rep Mutanten zu erwarten.

b) Wie Abb.10 zeigte, findet man auf den Primärselektionsplatten neben großen Kolonien mit geringerer Frequenz auch deutlich kleinere. Große und kleine Einzelkolonien wurden im folgenden getrennt untersucht. Nach den Untersuchungen von Mikrokolonien im Zusammenhang mit den in D.I.3.5. beschriebenen Inkompatibilitätstests war zu erwarten, daß solche Kolonien zwei Plasmide enthielten.

c) Das Testprogramm wurde um ein weiteres miniRP4-Derivat (RP4-5-4) erweitert, das in der Lage sein könnte, Replikations-defekte RP4-2 Plasmide zu transkomplementieren. Abb.13 zeigt die genetische Karte von RP4-5-4 im Vergleich zu dem üblicherweise eingesetzten Transkomplementationspartner pSR100.

Da RP4-5-4 andere Deletionen RP4-spezifischer Sequenzen erfahren hat als pSR100, könnte unterschiedliches Transkomplementationsverhalten der beiden Plasmide zu einer ersten Eingrenzung der Genregion dienen, die essentielle RP4-Gene trägt.

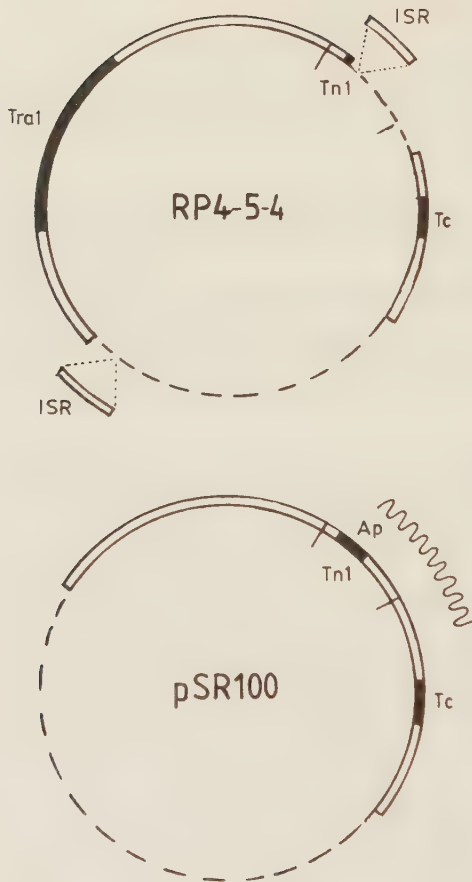


Abb. 13 : Vergleich der miniRP4-Derivate
pSR100 und RP4-5-4

RP4-5-4 wurde aus *Rhizobium lupini* isoliert (41). Das Plasmid trägt zwei ISR1-Elemente und hat die durch unterbrochene Kreislinien angezeigten Deletionen erfahren. Von den drei RP4-Resistenzmarkern ist nur noch Tc^r vorhanden.

pSR100 wurde bereits in Abb. 2 vorgestellt. Mit $\sim$ sind die RP4-spezifischen Sequenzen angedeutet, die pSR100 mehr hat als RP4-5-4.

d) Als neuer Test wird eine Plasmidanalyse der untersuchten Stämme eingeführt. Es handelt sich um ein Schnellverfahren, mit dem die Anzahl und ungefähre Länge der Plasmide eines Stammes festgestellt werden kann. Damit kann direkt die Anwesenheit von zwei unabhängigen Plasmiden (RP4-2::Mu und pSR100) in einer Zelle dokumentiert werden.

e) Neben den Transconjuganten-Kolonien, die nach Mu-Mutagenese des RP4-2 Donors entstanden, werden im folgenden auch solche untersucht, die aus der Kreuzung mit nicht-Mu-infizierten Kontrolldonoren stammen.

II.3.4. Nachtest von Mikrokolonien der Primärselektion

Es sei noch einmal auf Abb.10 verwiesen, wo 2 Kolonien markiert sind, die deutlich kleiner sind als normale E.coli Kolonien. Solche Mikrokolonien der ApKmSm42⁰C-Primärselektion wurden auf Stabilität des Ap-Markers nachgetestet. Etwa 90% der getesteten Mikrokolonien waren auch nach zwei Passagen auf KmSm noch Ap^r, besaßen also wahrscheinlich noch pSR100. Dieses Ergebnis steht in deutlichem Gegensatz zu den Verhältnissen, die bei großen Einzelkolonien gefunden werden; unter diesen konnten nur ca. 10% stabil Ap-resistente identifiziert werden. (vgl. D.II.3.5.)

20 stabil Ap^r Mikrokolonien wurden entsprechend dem Schema der Abb.11 weiterverarbeitet, diesmal als Strichkolonien. Diese Methode hat den Vorteil, mehr Zellmaterial zur Verfügung zu haben, was für den Plasmidtest im Schnell-Lyse-Verfahren wichtig ist.

Abb.14 faßt die Ergebnisse der Stempeltests zusammen.

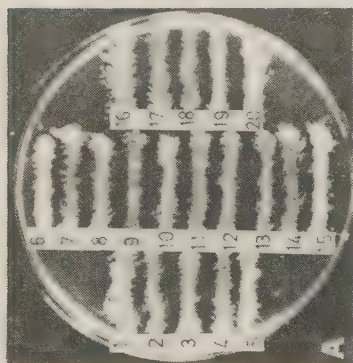
Die Ausgangsplatte (KmSm) wurde zur Kontrolle auf

ApSm und Sm42⁰C gestempelt. Die Ap-Resistenz weist auf pSR100 hin, die Hitzeresistenz auf Mu_c+ in RP4-2. Die Stempelkreuzungen wurden diesmal mit 3 Rezipienten durchgeführt: S302-20, S302-30(pSR100) und als neuer Rezipient S302-50(RP4-5-4).

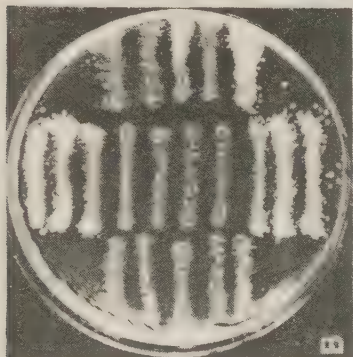
Die Auswertung der Transcojugantenplatten ergibt, daß 16 der 20 Donorkulturen ein "Tra⁻" Plasmid besitzen. Diese hohe Rate an "Tra⁻" Mutanten kann nicht mehr mit Mu-induzierten Mutationen erklärt werden, die normalerweise nur höchstens 50% RP4-Tra⁺Mu Plasmide liefert. Dieses Phänomen wird im Zusammenhang mit den Plasmidanalysen ausführlich diskutiert.

Die restlichen 4 Donorkulturen (in Abb. 14 nummeriert mit 5,6,9 und 15) besitzen definitionsgemäß Replikationsdefekte RP4-2 Mutanten. Sie transferieren ihr Plasmid nicht nach S302-20, wohl aber nach S302-30(pSR100). Eine dieser Donorkolonien liefert auch mit S302-50 (RP4-5-4) Transconjuganten (Nr.5). Das Replikationsdefekte RP4-2::Mu Plasmid dieser Kolonie kann sowohl von pSR100 als auch von RP4-5-4 transkomplementiert werden.

Die 20 Donorkolonien wurden von einer Reserveplatte abgenommen und lysiert. Die Gesamt-DNA wurde im Agarosegel zum Nachweis der Plasmid-DNA aufgetrennt. In Abb.15 sind die 20 Lysate nebeneinander aufgetragen, wobei die Positionsnummern den Koloniennummern der Ausgangsplatte entsprechen. Zur Kontrolle sind drei Stämme mit bekannten Plasmiden aufgetragen : Pos.21: pSR100, Pos.22: RP4-2 und Pos.23: RP4-2::Mu. Mit Hilfe dieser Kontroll-Lysate lassen sich die Längen der Plasmide in den Teststämmen abschätzen.



STEMPELTEST
↑

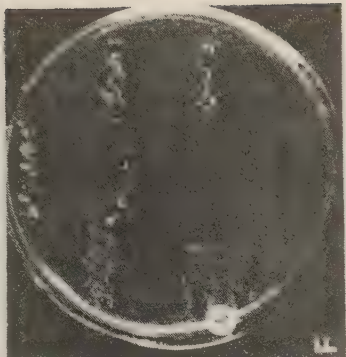
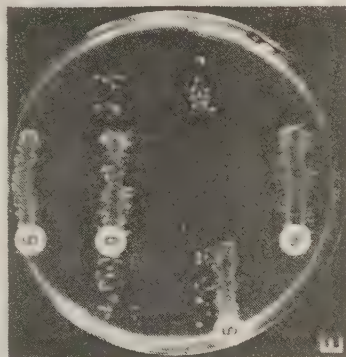
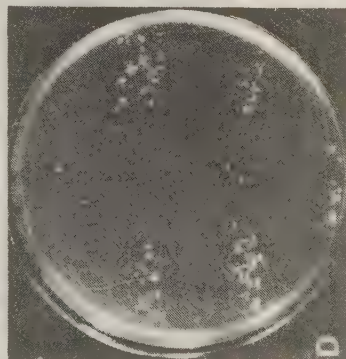


KmSm

Ausgangsplatte

ApSm

Sm 42°C



STEMPEL-
KREUZUNG

Trans-
conjuganten
auf KmRf

REZ I P I E N T E N

S 302-20

S 302-30 (p SR100)

S 302-50 (RP/4,5-4)

Abb. 14

(Legende siehe
nächste Seite)

Abb. 14 : Nachtest auf RP4-2-Rep::Mu Mutanten (4a) :

Nachtest von stabil Ap^r Mikrokolonien der Primärselektion

Die Stempeltests wurden gemäß dem allgemeinen Schema der Abb. 11 sowie dem in D.II.3.3. erläuterten erweiterten Versuchskonzept durchgeführt. Die Ergebnisse werden in D.II.3.4. diskutiert.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23

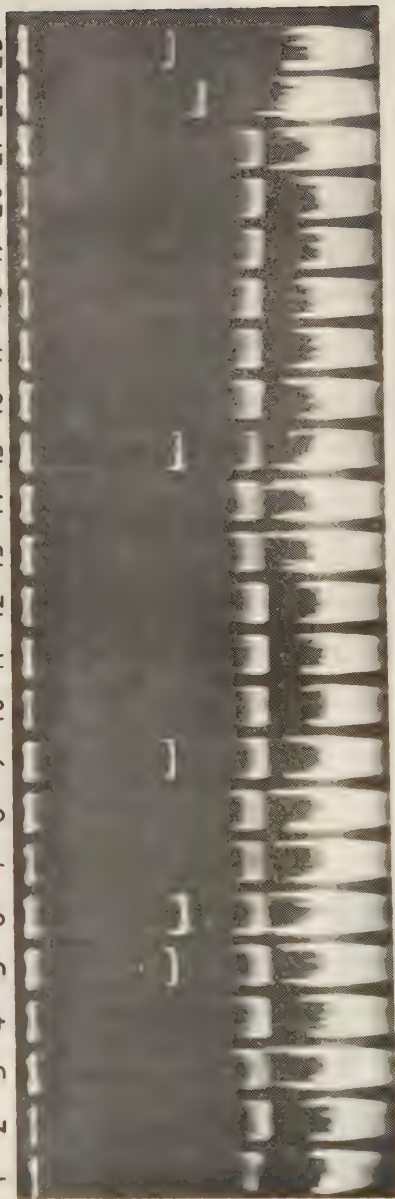


Abb. 15 : Nachtest auf RP4-2-Rep::Mu Mutanten (4b) :
Plasmidanalysen der Stämme des Stempeltests der Abb. 14

Die Positionsnummern entsprechen den Koloniennummern der Teststämme der Abb. 14.
Als Plasmidlängen-Kontrollen wurden in pos. 21 p⁺100, pos. 22 RP4-2 und
pos. 23 RP4-2::Mu aufgetragen.

Die Stämme, in denen im genetischen Experiment (=Stempeltransfer) eine RP4-2-Rep Mutante nachgewiesen wurde (Abb.14 Nr.5,6,9 und 15) besitzen alle ein stark verlängertes RP4-2 Plasmid (Abb.15 Pos.5,6,9,15) Drei dieser Plasmide erreichen die Länge des Kontroll-Plasmides der Pos.23, sind also echte RP4-2::Mu-Hybridplasmide. Das Plasmid der Pos.6 ist etwas kürzer als die drei anderen Mutanten. Hier hat vermutlich Mu-Insertion und anschließende Deletion im Plasmid stattgefunden.

Neben den RP4-2-Rep::Mu Plasmiden finden sich in allen vier Stämmen auch die pSR100 Plasmide, wie es nach der Theorie der Transcomplementation zu erwarten ist. Die anderen 16 Stämme waren im Stempeltest nicht in der Lage, RP4-2::Mu zu transferieren, obwohl sie die Marker dieses Plasmids (Km^r 42^0C^r) besitzen. Die RP4-2 Plasmide dieser Stämme wurden bisher als "Tra⁻" Mutanten bezeichnet. Die Agarosegel-Analyse der Kolonien zeigt jedoch, daß nur pSR100 als selbständiges Plasmid nachweisbar ist. Eine Erklärung hierfür wäre, daß das RP4-2::Mu Plasmid, das nach der Mu-Mutagenese in diese Stämme transferiert und auf das selektioniert wurde, im Verlauf der weiteren Anzucht ins Chromosom integriert wurde. Damit ist die Möglichkeit eines effektiven Transfers nicht mehr gegeben, das Plasmid erscheint phänotypisch Tra⁻. In den in D.III.2. beschriebenen Untersuchungen zur Stabilität von RP4-2-Rep Mutanten wird die hier vermutete Integration von RP4-2::Mu ins Chromosom genetisch durch den Nachweis der Hfr-Eigenschaft solcher Stämme bewiesen.

Nach den oben beschriebenen Plasmidanalysen und den dazu gegebenen Interpretationen sind auch die drei Ap^r "Tra⁻" Kolonien erklärlich, die in D.II.3.2. beim Nachtest zufällig verteilter Einzelkolonien gefunden wurden.

II.3.5. Nachtest von großen Einzelkolonien der Primärselektion auf RP4-2::Mu und von Kontrollstämmen

Die Mehrzahl der Kolonien, die nach Mu-Mutagenese von RP4-2, Transfer nach 53032-111(pSR100) und Selektion auf $ApKmSm42^D$ C entstehen, sind normal groß (vgl. Abb.10). Beim Nachtest (= weitere Anzucht auf KmSm und Überstempeln auf $ApSm$) zeigt es sich aber, daß nur etwa 10% von ihnen stabil Ap -resistent sind. Bei den kleinen Einzelkolonien lag der Anteil von stabil Ap^r Kolonien bei etwa 90% (vgl. D.II.3.4.).

10 große, stabil Ap^rKm^r Einzelkolonien wurden entsprechend dem Test der Mikrokolonien weiteruntersucht. (Abb.16 Kol.Nr 1-10).

In Kap. D.II.2. wurden ausführlich die Experimente der Mu-Mutagenese beschrieben. Parallel dazu wurde dort auch die Kontrolle, nämlich die Verwendung eines nicht-Mu-infizierten RP4-2 Donors, dargestellt (vgl. Abb.9 und Tab.9). Selektioniert man Transconjuganten dieser Kontrollkreuzungen auf $ApKmSm$, findet man ebenfalls überwiegend normal gewachsene Kolonien. Die Inkubationstemperatur darf allerdings nicht höher als 32^D C sein, da der Rezipient Mu_{cts} lysogen ist und keine $RP4-2::Mu_c+$ Hybride transferiert werden.

Mit sehr geringer Frequenz ($\ll 1\%$) kann man auch mit nicht-mutierten RP4-2 Plasmiden stabil Ap^rKm^r Trans-

conjuganten finden. 10 dieser Kontroll-Kolonien wurden weiteruntersucht (Abb.16 Kol.Nr. 11-20).

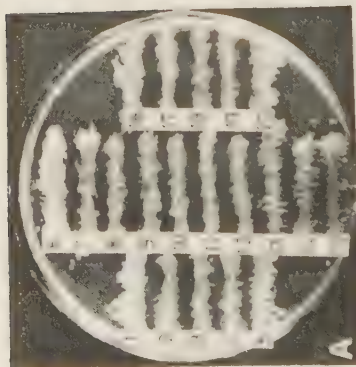
In Abb.16 sind die Stempelergebnisse gezeigt, die mit den 10 großen Einzelkolonien des Teststammes (Nr.1-10) und den 10 Kontrollstämmen (Nr.11-20) erzielt wurden. Die Ausgangsplatte wurde wieder auf ApSm und Sm42⁰C gestempelt. Der Marker Ap^r ist in den ausgewählten Kolonien stabil. Die 10 Kolonien, die RP4-2::Mu_c⁺ enthalten (Abb.16 Nr.1-10) sind hitzeresistent, während die 10 Kontroll-Kolonien bei dieser Temperatur aufgrund der Hitzeinduktion des Mu_{cts}-Prophagen lysieren (Abb.16 Nr.11-20).

Die Stempeltransferexperimente lieferten folgende Resultate:

Nur eine Kolonie des Teststammes besitzt ein gut transferierbares Plasmid (Abb.16 Nr.6). Der Transfer dieses Plasmides ist mit allen drei Rezipienten gleich gut, es handelt sich also nicht um eine Replikationsdefekte Mutante von RP4-2. Stamm Nr.3 transferiert sein Plasmid nur schlecht weiter, die Plasmide der übrigen Testkolonien erscheinen wieder phänotypisch "Tra⁻".

Die Kontroll-Kolonien (Abb.16 Nr.11-20) transferieren ihr Plasmid alle mit hoher Frequenz, unabhängig vom Rezipientenstamm. Es konnten weder "Tra⁻" noch Rep⁻ Mutanten in den nicht Mu-infizierten Kontroll-Kreuzungen gefunden werden.

Abb.17 zeigt die Plasmidanalysen der Stämme der oben beschriebenen Experimente.



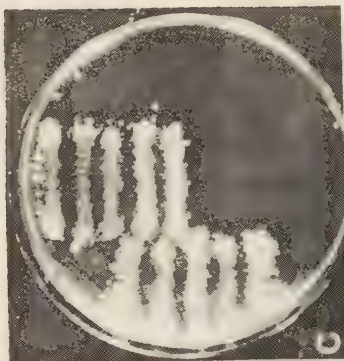
KmSm

Ausgangsplatte

STEMPELTEST
↑



ApSm



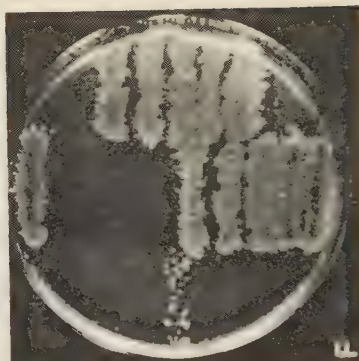
Sm 42°C



S 302-20



S 302-30 (p SR 100)



S 302-50 (RP 4, 5-4)

STEMPEL-
KREUZUNG

Trans-
conjuganten
auf KmRf

REZIPIENTEN

Abb. 1F

(Legende siehe
nächste Seite)

Abb. 16 : Nachtest auf RP4-2-Rept:Mu Mutanten (5a) :

Nachtest von stabil Ap^r großen Einzelkolonien

Die Stempeltest wurden analog zu denen der Abb.14 durchgeführt.

Test Nr. 1-10 sind Transconjuganten mit RP4-2:Mu Mutanten, während die Kolonien 11-20 aus der Mu-freien Kontroll-Kreuzung stammen.

Die Ergebnisse werden in 0.II.3.5. diskutiert.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23

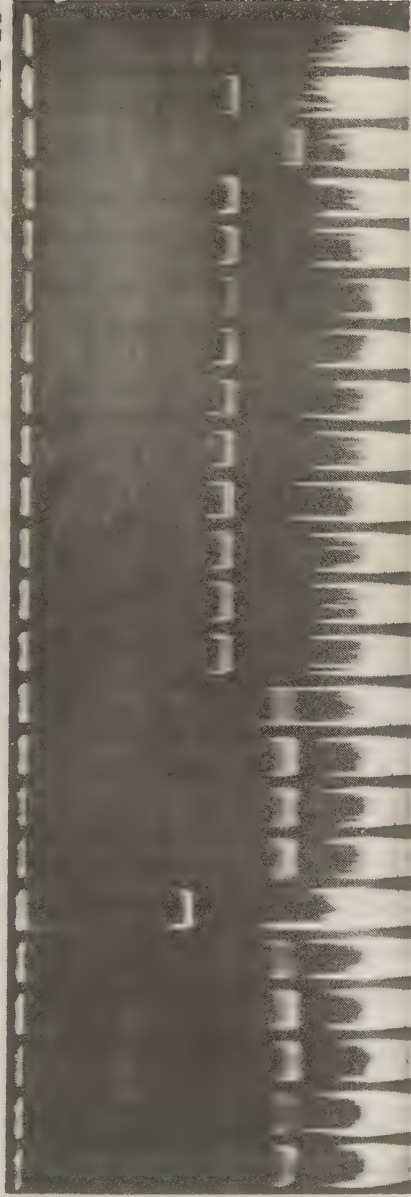


Abb. 17 : Nachtest auf RP4-2-Rept:Mu Mutanten (5b) :

Plasmidanalysen der Stämme des Stempeltest der Abb.16

Die Positionsnummern entsprechen den Koloniennummern der Teststämme der Abb.16.
Die Längenstandards sind wieder pBR100 (Pos.21) RP4-2 (Pos.22) und
RP4-2:Mu (pos.23).

Die Pos.Nr. 1-10 enthalten die Lysate der Testkolonien nach Mu-Mutagenese des Donors, Pos.Nr. 11-20 die Lysate der Kontrollstämmen. In Pos.Nr. 21,22 und 23 sind wieder die Vergleichsplasmide pSR100, RP4-2 und RP4-2::Mu aufgetragen.

Abb.17 Pos.6 zeigt den Teststamm, der als einziger ein gut transferierbares Plasmid besitzt. Der Länge entsprechend handelt es sich um ein RP4-2::Mu Hybrid. pSR100 ist in diesem Stamm nicht als freies Plasmid nachweisbar, obwohl sein Resistenzmarker Ap stabil vorliegt. Hierfür gibt es zwei Erklärungsmöglichkeiten. pSR100 könnte als ganzes Plasmid ins Chromosom integriert worden sein oder es könnte Transposition von Tn1 (Ap), das auf pSR100 im Gegensatz zu RP4-2 intakt vorliegt, ins Chromosom stattgefunden haben. In den übrigen 9 Teststämmen ist nur pSR100 als Plasmid vorhanden, während RP4-2::Mu wahrscheinlich ins Chromosom integriert wurde (analog der Situation bei den getesteten 20 Mikrokolonien).

Die 10 Kontrollstämmen dagegen zeigen ein einheitliches Plasmidmuster : in keinem Fall ist pSR100 nachweisbar, trotz stabiler Ap-Resistenz der Kolonien. Zur Erklärung könnte wieder Integration von pSR100 oder Tn1-Transposition herangezogen werden.

RP4-2 wird in den nicht-Mu-mutagenisierten Kontrollstämmen in unveränderter Länge gefunden (vgl. Abb.17 Pos.11-20 mit Pos.22=RP4-2). Für das Auftreten der Doppelbande an der Stelle, wo RP4-2 normalerweise bandiert, konnte bisher keine befriedigende Erklärung gefunden werden. Plasmid-DNA, die aus diesen Stämmen über CsCl-EtBr-Dichtegradientenzentrifugation gereinigt wurde, weist wieder eine einheitliche Länge auf.

Die Doppelbande ist daher nicht auf zwei Plasmide mit leicht unterschiedlichen Molekül-Längen zurückzuführen. Sie könnte evtl. etwas mit Konfigurationsänderungen von RP4-2-Plasmid-DNA in diesen Stämmen zu tun haben. Auch auf der Höhe von pSR100 wurden im Gel manchmal Doppelbanden gefunden (vgl. Abb.15 und 17). Auch hier handelt es sich vermutlich um Plasmide, die aufgrund von Konfigurationsänderungen dieses Phänomen zeigen, denn die gereinigte Plasmid-DNA weist eine einheitliche Länge auf.

II.4. Zusammenfassung der Ergebnisse der Mu-Mutagenese

Die Ergebnisse des Kapitels II. haben gezeigt, daß Mu-Mutagenese eine geeignete Methode zur Isolierung von Replikations-defekten RP4-2-Plasmiden ist. Der entscheidende Vorteil der Mutagenese über Mu-Infektion gegenüber anderen Methoden dürfte sein, daß die mutierten Plasmide sofort nach Mu-Insertion in einen neuen Rezipienten transferiert werden können. Die Kreuzungsergebnisse der Tab.9 dokumentieren, daß Mu-infizierte Donorstämme in ihrer Donor-Eigenschaft nicht beeinträchtigt sind. Damit sind auch essentielle Plasmidgene mutierbar, soweit sie für ein transdominantes Genprodukt codieren, denn nach Transfer in den neuen Rezipienten ist aufgrund der dort vorhandenen pSR100 Plasmide Transcomplementation möglich.

Aus einem Mutageneseansatz sind, wie das in D.II.2. vorgestellte Beispiel zeigt, etwa 10^4 RP4-2::Mu Mutanten zu erwarten. Nachdem Mu keine spezifischen Insertionsstellen in der Wirts-DNA erkennt, sollte theoretisch für jedes Gen von RP4-2 eine entsprechende Insertions-

mutante gefunden werden können, wenn ein geeignetes Testsystem für die gesuchten Mutanten zur Verfügung steht.

Das genetische Testverfahren für RP4-2-Rep Mutanten besteht aus zwei Abschnitten.

Der erste Schritt ist der Nachweis der Resistenzmarker der zwei Plasmide RP4-2::Mu (Km) und pSR100 (Ap) in einem Klon. Hintergrund hierfür ist, daß Zellen mit RP4-2-Rep⁻ Plasmiden (selektioniert auf Km) trotz Inkompatibilität pSR100 (Ap) als Transcomplementationspartner mitvermehrten müssen.

Die erste Anreicherung von ApKm-resistenten Zellen geschieht nach der Mutagenese und dem Transfer der Plasmidmutanten in der Primärselektion auf ApKmSm42⁰C. Im nachfolgenden Stempeltest werden dann stabil Ap^rKm^r Klone gefunden.

Im Verlauf dieser Untersuchungen wurden große und kleine Einzelkolonien der Primärselektion getrennt getestet. Dabei fiel auf, daß etwa 90% der Mikrokolonien nach zwei Passagen auf Km immer noch stabil Ap^r waren, während dies nur für etwa 10% der großen Kolonien zutraf. Analoge Beobachtungen wurden bereits bei den Inkompatibilitätsuntersuchungen in Kapitel D.I.3.5. gemacht. Kolonien, die nach Transduktion von RP4-2 tragenden Rezipienten mit pSR100 entstanden waren, wuchsen sehr langsam, solange sie beide Plasmide vermehrten.

Im Verlauf der weiteren Nachtests wurde klar, daß stabile ApKm-Resistenz kein Beweis für RP4-2-Rep-Mutanten bzw. die Anwesenheit zweier Plasmide in einer Zelle ist, sondern nur zur Anreicherung der gesuchten Mutanten dienen kann.

Der Defekt im Replikationssystem von RP4-2 kann eindeutig erst, durch weitere Kreuzungen der ApKm-resistenten Kolonien nachgewiesen werden. In Kapitel D.II.3. wurden hierzu Stempeltransferexperimente durchgeführt, um eine größere Anzahl von Kolonien testen zu können. Diese Tests sind empfindlich genug, um durch Vergleich der beiden Transconjugantenplatten mit S302-20 bzw. S302-30(pSR100) Rezipienten zweifelsfrei solche Donorkolonien identifizieren zu können, die ein RP4-2-Rep:Mu Plasmid besitzen. Diese Mutanten werden nämlich nur in pSR100-haltigen Rezipienten etabliert, nicht aber im Plasmid-freien Kontroll-Rezipienten.

RP4-5-4, ein anderes miniRP4-Derivat, ist nicht in der Lage, alle RP4-2-Rep Mutanten zu complementieren, die mit Hilfe von pSR100 als Transcomplementationspartner isoliert wurden. Das läßt erste Rückschlüsse auf die Genregion zu, die essentielle RP4-Gene enthält, wirft aber gleichzeitig die Frage auf, wie RP4-5-4 ohne diese Funktionen auskommen kann.

Neben den genetischen Nachweisverfahren wurde eine neue Untersuchungsmethode eingeführt, die direkte Plasmidanalyse im Agarosegel.

Damit konnte eindeutig die Anwesenheit von RP4-2::Mu Hybridplasmiden und pSR100 in den Stämmen nachgewiesen werden, die nach den genetischen Ergebnissen Replikationsdefekte RP4-2 Plasmide enthalten sollten.

In den Stempeltransferversuchen wurden mit hoher Frequenz Stämme gefunden, die trotz stabiler Vererbung der Marker von RP4-2::Mu (Km^r und 42^{OCr}) dieses Plasmid nicht weitertransferierten. Die Rohlysatanalyse zeigte, daß RP4-2::Mu aus solchen Zellen nicht als freies Plasmid isolierbar ist. Die Vermutung lag an dieser Stelle nahe,

daß RP4-2::Mu ins Chromosom integriert worden war. Daß diese Möglichkeit der chromosomalen RP4-Integration tatsächlich besteht, wird in Kap. D.III.2. genetisch durch den Nachweis der Hfr-Eigenschaft solcher Klone demonstriert.

Nachdem geklärt worden war, daß die getesteten Strichkulturen, die ursprünglich von Mikrokolonien abstammten, im Transferexperiment negative Resultate lieferten und im Agarosegel nur ein Plasmid (pSR100) erkennen ließen, wurden sie erneut auf Einzelkolonien ausgestrichen. Dabei erschienen wieder überwiegend normal große Kolonien. Im Verlauf der Strichkultur- und Stempelpassagen waren aus den Mikrokolonien offenbar wieder normal wachsende Stämme geworden.

Diejenigen Mikrokolonien, die nach den Ergebnissen der beschriebenen Experimente (=Stempeltransfer und Plasmidanalyse) echte Rep⁻ Mutanten enthielten, bildeten nach Koloniereinigung oft große und kleine Einzelkolonien in wechselnden Zahlenverhältnissen.

Damit stellte sich die Frage nach der Stabilität der Replikations-defekten RP4-2 Mutanten. Dieses Problem wird in Kapitel D.III.2. ausführlich behandelt.

D.III. Genetische Charakterisierung von RP4-2-Rep::Mu Mutanten

Die im vorangegangenen Kapitel D.II. beschriebenen Experimente zur Konstruktion von RP4-2-Rep Plasmiden wurden mehrmals durchgeführt. Aus verschiedenen Ansätzen wurden dabei bisher 11 Replikations-defekte RP4-2 Mutanten isoliert, die sich als relativ stabil erwiesen.

Im folgenden werden diese Plasmide einfach mit "Rep" bezeichnet und von Rep1 bis Rep11 nummeriert.

Die 11 Mutanten werden in den einzelnen Abschnitten des Kapitels III genauer charakterisiert.

III.1. Plasmidlängenklassen

Die Bilder der Plasmidanalysen in den vorangegangenen Tests zeigten bereits die Möglichkeit, daß neben reinen RP4-2::Mu Hybridplasmiden auch kürzere Derivate davon auftreten können (vgl. Abb.15).

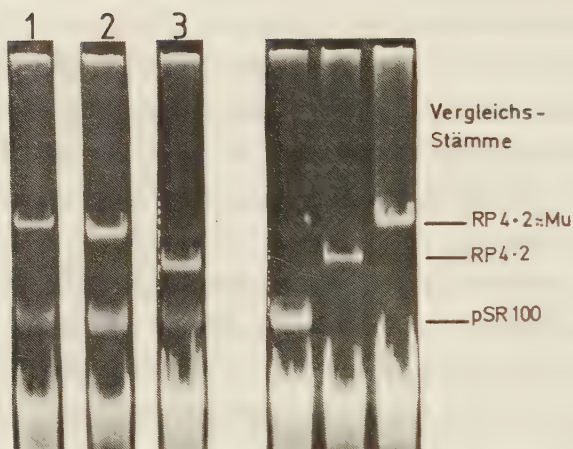
In Abb.18 wurde eine Einteilung der 11 bisher isolierten Rep-Mutanten in Längenklassen vorgenommen.

Die Plasmidlängen wurden aus Rohlysaten der Wirtsstämme im Vergleich zu den Kontrollstämmen mit den Plasmiden pSR100, RP4-2 und RP4-2::Mu bestimmt.

In Längenkasse 1 sind echte RP4-2::Mu Hybridplasmide enthalten, repräsentiert durch Rep1, 3, 4 und 5.

Längenkasse 2 faßt "RP4-2::Mu-Deletionen" zusammen.

Hier hat neben Mu-Insertion zusätzlich eine Deletion der Plasmid-DNA stattgefunden. Die Deletion ist nicht sehr groß (wenige μm) und scheint in den Mutanten Rep2, 6, 7, 10 und 11 annähernd gleich lang zu sein.



Nr	Plasmide	Bemerkung
1	Rep1/3/4/5	Mu-Insertion
2	Rep2/6/7/10/11	Mu-Insertion + Deletion
3	Rep8	Deletion

Abb. 18 : Charakterisierung von RP4-2-Rep Mutanten (1):

Plasmidlängenklassen

In Lysat Nr. 1 bis 3 ist jeweils ein Vertreter der in der dazugehörigen Tabelle aufgeführten Stämme gezeigt.

Eine Mutante (Rep8) ist vermutlich eine reine Deletionsmutante, sie ist geringfügig kürzer als das Ausgangsplasmid RP4-2. Es wurde bisher nicht untersucht, ob in diesem Plasmid noch Mu-DNA enthalten ist. Die Deletion kann erst im Verlauf der Anzucht dieses Stammes entstanden sein, denn alle RP4-2 Mutanten wurden primär so selektioniert, daß sie Mu_c^+ Insertionen tragen (= $42^{\circ}C$ Selektion in Mu_{cts} -lysogenen Rezipienten). Rep8 verleiht einer Mu_{cts} -lysogenen Zelle keine Hitze-resistenz mehr. Das Mu_c^+ Genom oder große Teile davon scheinen unter Mitnahme von Plasmid-DNA deletiert worden zu sein.

Die Mu-Insertion in den echten RP4-2-Rep::Mu Hybridplasmiden wurde in Heteroduplexanalysen kartiert. Die Ergebnisse der Kartierung werden in D.IV. diskutiert.

III.2. Stabilität von RP4-2-Rep::Mu Mutanten

In Abschnitt D.II.3.5 wurde bereits angedeutet, daß nicht mit absoluter Stabilität von Rep-Mutanten gerechnet werden kann. Dies wurde daran gezeigt, daß aus Mikrokolonien, die wahrscheinlich Rep-Mutanten besaßen, nach einigen Passagen wieder normal wachsende Kolonien hervorgingen.

Im folgenden Kapitel sollen die Möglichkeiten der Reversion am Beispiel einiger Rep-Mutanten näher untersucht werden. Mit "Reversion" sollen hierbei zusammenfassend alle Vorgänge bezeichnet werden, die dazu führen, daß die Marker und/oder das typische Kreuzungsverhalten von Stämmen mit RP4-2-Rep Mutanten nicht mehr nachweisbar sind.

Zur Verdeutlichung ist in der ersten Zeile der Tab.10 der normale Phänotyp eines Stammes mit Rep-Plasmid (Rep-X) und Transcomplementationspartner pSR100 noch einmal zusammengefaßt.

Die aufgeführten genetischen Eigenschaften lassen sich wie folgt begründen :

Ap^r : stammt von pSR100 (ist aber kein Beweis für dessen Anwesenheit als freies Plasmid).

Km^r : kann nur von RP4-2 codiert werden.

Tc^r : sowohl pSR100 als auch RP4-2 besitzen diese Resistenzdeterminante; der Marker Tc^r besitzt daher wenig Aussagekraft.

42⁰C^r : ist ein Beweis für Mu_c+ Insertion in RP4-2

Transferverhalten : wurde getestet in Stempelkreuzungen mit S302-20 und S302-30(pSR100). Ein Rep-Plasmid bildet nur mit S302-30(pSR100) Transconjuganten.

Anmerkung : Km 42⁰C - Resistenz kann von freien oder integrierten RP4-2::Mu_c+ Plasmiden vermittelt werden.

Tab.10 gibt einen Überblick über die verschiedenen Arten der Reversion, die bisher mit den sechs oben beschriebenen Tests gefunden wurden.

Die genetischen Befunde wurden in der Spalte "Bemerkungen" anhand einer ersten Deutung zusammengefaßt. Das Plasmidmuster der Revertanten wird an konkreten Beispielen in Tab.12 gezeigt.

Reversion A : a) alle Resistenzmarker vorhanden

b) kein Transfer nachweisbar

Erklärung : RP4-2::Mu liegt integriert im Chromosom vor. Der Nachweis von Hfr-Eigenschaften von RepX-A Stämmen wird am Ende von Kap. D.III.2. erbracht.

Plasmid	Eigenschaften						Bemerkung
	Ap	Km	Tc	42°C	x302-20	x302-30 (pSR100)	
RepX + pSR100	+	+	+	+	0	+	RP4-2 Rep::Mu _C + pSR100
RepX-A	+	+	+	+	0	0	RepX integriert, Hfr, pSR100
RepX-B	+	+	+	+	+	+	Ap ^r -Revertante (+Mu _C +)
RepX-C	0	+	+	+	+	+	Ap ^S -Revertante (+Mu _C +)
RepX-D	+	0	+	0	0	0	RepX-Verlust pSR100
RepX-E	0	+	+	0	+	+	Ap ^S -Revertante (-Mu _C +)

Tab. 10 : Charakterisierung von RP4-2-Rep Mutanten (2):

Eigenschaften von Rep-Revertanten

Die erste Zeile faßt die genetischen Eigenschaften von Stämmen mit Rep-Plasmid und pSR100 zusammen.

Mit A bis E werden die verschiedenen Arten der "Reversion" bezeichnet.

In der Spalte Bemerkungen sind die in D.III.2. diskutierten Befunde kurz zusammengefaßt.

Reversion B : a) alle Resistenzmarker vorhanden
 b) gleich guter Transfer in beide Rezipienten
 c) Zusatztest: Transconjuganten, die nach Transfer von RepX-B auf Km selektioniert wurden, sind im Nachtest alle auch Ap^R . Da pSR100 nicht mobilisierbar ist, muß die Ap-Resistenz auf RepX-B liegen.
 Erklärung : Ap^R -Revertante, d.h. die Rep-Mutation ist verloren, dafür wurde die Ap-Resistenz dazugewonnen.

Reversion C : a) Verlust von Ap^R , d.h. Verlust von pSR100
 b) gleich guter Transfer in beide Rezipienten
 Erklärung : Reversion von Rep^- zu Rep^+ und anschließende Verdrängung des dann nicht mehr benötigten pSR100. Die Reversion bedeutet nicht Verlust der Mu-Insertion. Evtl. wurde die Rep-Mutation durch eine zweite, spontane Mutation im Plasmid supprimiert.

Reversion D : a) Verlust der Resistenzmarker von RP4-2::Mu(Km^S , 42^{OC^S}); $Ap^R Tc^R$ (pSR100) vorhanden
 c) Kein Transfer nachweisbar
 Erklärung : Verlust der Rep-Mutante ⁺)

+) Anmerkung : Wenn tatsächlich vollständiger Verlust des Rep-Plasmides vorliegt, sind die Bezeichnungen "RepX-D" und "Reversion" nicht gerechtfertigt, wurden jedoch zur Vereinfachung der Tabelle beibehalten.

Reversion E : a) Verlust von Ap^{r} (pSR100) und
Verlust von $42^{\text{O}}\text{C}^{\text{r}}$ (Mu_c + Insertion)
b) gleich guter Transfer in beide
Rezipienten
Erklärung : Ap^{S} Revertante ohne Mu_c +, d.h.
wahrscheinlich echte Reversion der Muta-
tion durch exakte Mu-Excision aus dem
mutierten Gen.

Die Aufstellung der Tab.10 zeigt, daß es mindestens
fünf verschiedene Möglichkeiten der Reversion von
Rep-Mutationen gibt:

RepX-A : Integration des Rep-Plasmids

RepX-B : Reversion zu Rep^+ ohne Verlust der Mu-Insertion
und unter Zugewinn der Ap-Resistenz.

RepX-C : Reversion zu Rep^+ ohne Verlust der Mu-Insertion.

RepX-D : Verlust der Rep-Mutante

RepX-E : Reversion zu Rep^+ durch Verlust der Mu-Insertion.

Diese Revertanten wurden gefunden, als nach Einzel-
koloniepässagen von Mikrokolonien der ursprünglichen
Rep-Mutanten-Stämme wieder große Einzelkolonien auf-
traten und diese den in Tab.10 beschriebenen genetischen
Tests unterzogen wurden.

Eine Auswahl von Rep-Mutanten wurde im folgenden sys-
tematisch auf ihre Stabilität untersucht. Hierzu
wurden Mikrokolonien von $\text{KmSm}42^{\text{O}}\text{C}$ -Selektionsplatten
unselektiv (in RGM-Medium) angezogen.

Als Start-Test wurden Kreuzungen mit den Rezipienten
S302-20 und S302-30 (pSR100) durchgeführt, um die ur-
sprüngliche Anwesenheit von Rep-Mutanten nachzu-
weisen. Anschließend wurden die Kulturen über ca. 40
Generationen ohne Selektionsdruck weiterinkubiert.

Aus jeder Kultur wurden 100 Einzelkolonien im Stempelverfahren auf ihre genetische Eigenschaften entsprechend der Aufstellung in Tab.10 untersucht. Tab.11 faßt die Ergebnisse dieser Tests zusammen. Die Experimente wurden mit den Plasmiden Rep 1, 2, 3, 5 und 6 durchgeführt.

Mit "Rep" ist der Anteil der Zellen bezeichnet, der noch das ursprüngliche Rep-Plasmid besitzt. Die Arten der Reversion sind mit A bis E bezeichnet; deren Eigenschaften wurden in Tab.10 vorgestellt. Als relativ stabil erwiesen sich die Mutanten Rep1 (nur 2% Reversion A) und Rep5 (100% Rep). Die anderen drei Rep-Mutanten lieferten mit hoher Frequenz verschiedene Revertanten. Rep3 war nach 40 Generationen in keiner der 100 getesteten Kolonien mehr vorhanden.

Die Prozentwerte, mit denen die einzelnen Revertantenarten auftraten, sind nicht als charakteristisch für die jeweilige Rep-Mutante zu betrachten. In Wiederholungen der Stabilitätsexperimente wurden z.T. andere Werte gefunden, die jedoch nicht den folgenden zusammenfassenden Aussagen widersprechen :

1) Es gibt Rep-Mutanten, die relativ stabil über viele Generationen ohne Selektionsdruck vermehrt werden. In diesen Zellen wird auch pSR100 mitrepliziert, obwohl die starke Inkompatibilität zwischen RP4-2 und pSR100 dies normalerweise nicht erlaubt.

2) Selektion auf $Km42^{0C}$ ist keine Garantie für Stabilität der Anwesenheit von RP4-2-Repl. Mu.

Ausgangs- Plasmid	Plasmidvarianten nach ca. 40 Generationen (%)					
	Rep	A	B	C	D	E
Rep1	98	2	-	-	-	-
Rep2	16	20	40	-	24	-
Rep3	-	8	4	84	-	4
Rep5	100	-	-	-	-	-
Rep6	20	48	12	-	20	-

Tab. 11 : Charakterisierung von RP4-2-Rep Mutanten (3):
Stabilitätstest

Stämme mit 5 verschiedenen Rep-Mutanten wurden ohne Selektionsdruck angezogen. Nach Ausplattieren auf ebenfalls nicht-selektivem Medium wurden je 100 zufällig verteilte Einzelkolonien den in Tab.10 genannten Tests im Stempelverfahren unterworfen.

Die Werte geben die Prozentzahlen an, mit denen die einzelnen Plasmidvarianten A bis E bzw. der Ausgangstyp "Rep" gefunden wurde.

Es gibt Reversionsmöglichkeiten (A,B und C), die den Zellen nach Verlust des Rep⁻ Phänotyps weiterhin Resistenz gegen Km und 42°C verleihen.

Lediglich Reversion E (Mu_c+ Verlust) könnte durch 42°C-Inkubation verhindert werden. RepX-E wird jedoch nur in seltenen Fällen gefunden (vgl. Tab.11).

3) Verlust der Rep-Mutante (in den Tabellen 10 und 11 mit Reversion D bezeichnet) ist ein erstaunlich seltenes Ereignis. Entweder besitzt pSR100 keine Inkompatibilitätsfunktionen, die RP4-2-Mutanten wirksam verdrängen könnten, oder RP4-2 hat zusätzliche Eigenschaften, die eine derartige Inkompatibilitätsreaktion überkompensieren. Analoge Beobachtungen wurden auch bei den Inkompatibilitätsexperimenten zwischen pSR100 als Donor-Plasmid und RP4-2-Tc::Mu als Rezipienten-Plasmid gemacht (vgl. D.I.3.5.).

4) Verlust beider Plasmide des Transcomplementationsystems (RP4-2-Rep und pSR100) wurde bisher nie nachgewiesen. Mit dieser Möglichkeit wurde zunächst am häufigsten gerechnet. Man sollte annehmen, daß RP4-2-Rep::Mu bei nichtselektiver Anzucht aufgrund seiner Inkompatibilitätseigenschaften pSR100 aus den Zellen verdrängt, dann nicht mehr repliziert wird und sehr schnell selbst verloren geht. Diese Form der Instabilität wurde erstaunlicherweise jedoch nie gefunden.

Die Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchungen werden in E.III.2. ausführlich diskutiert.

Die Untersuchungen zur Stabilität der Rep-Plasmide wurden durch Plasmidanalysen der Revertantenstämme ergänzt. Die Gelelektrophorese dieser Stämme ist in Abb.19 gezeigt.

Abb.19 Test Nr.1 und 2 sind Kontrollstämme :

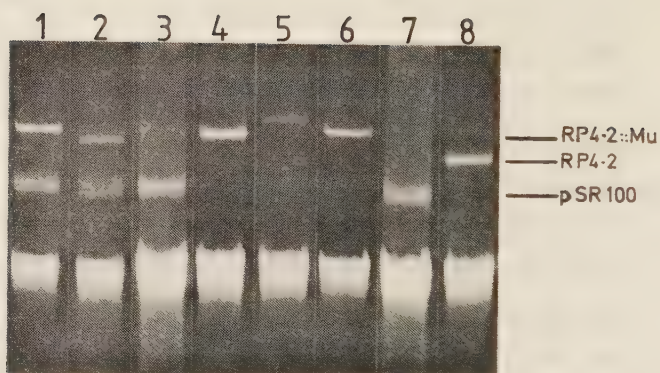
Rep1 (=RP4-2::Mu) und Rep2 (=RP4-2::Mu + Deletion), beide mit ihrem Transcomplementationsplasmid pSR100.

Abb.19 Test Nr.3 : Die Revertanten RepX-A besitzen alle nur pSR100 als freies Plasmid. Die RP4-2::Mu Plasmide liegen integriert im Chromosom vor.

Abb.19 Test Nr. 4 und 5 : Für RepX-B wurden bisher drei verschiedene Plasmidlängen gefunden. In Reversion B wurde genetisch neben der Umwandlung Rep⁻ zu Rep⁺ auch der Zugewinn des Markers Ap gezeigt. Dabei kann die Länge des betreffenden Plasmids gleich bleiben, wenigstens im Rahmen der Auflösung der verwendeten Methode der Gelelektrophorese (Beispiel Rep3-B) oder geringfügig zunehmen (Beispiel Rep2-B; Rep2 war ursprünglich eine RP4-2::Mu-Deletionsmutante, wie Test Nr.2 des Gels zeigt, Rep2-B weist wieder normale RP4-2::Mu Länge auf). Das Beispiel Rep6-B zeigt, daß auch deutlich längere Plasmide entstehen können, die phänotypisch der Reversionsart B zuzuordnen sind. Hierbei könnte es sich um Co-integrate aus einem Rep-Plasmid mit pSR100 handeln.

Abb.19 Test Nr.6 : Für RepX-C wurde genetisch die Reversion Rep⁻ zu Rep⁺ ohne Mu-Verlust gefunden. Das Beispielpiasmid Rep3-C zeigt keine Veränderung der ursprünglichen Plasmidlänge.

Abb.19 Test Nr.7 bestätigt den RP4-2::Mu-Plasmidverlust für "Reversion D".



Nr	Stamm	Bemerkungen
1	Rep 1	pSR100 + RP4-2-Rep::Mu
2	Rep 5	pSR100 + RP4-2-Rep::Mu (+Deletion)
3	Rep 1A/2A/3A/6A	pSR100; Rep-Plasmid integriert (Hfr)
4	Rep 2B/3B	Ap ^r "Revertante" von RP4-2-Rep::Mu (normale RP4-2::Mu-Länge)
5	Rep 6B	Ap ^r "Revertante" von RP4-2-Rep::Mu (Cointegrat aus RP4-2::Mu und pSR100)
6	Rep 3C	Ap ^s "Revertante" von RP4-2-Rep::Mu (normale RP4-2::Mu-Länge)
7	Rep 2D/6D	pSR100; Rep-Plasmid-Verlust
8	Rep 3E	Ap ^s "Revertante" von RP4-2-Rep::Mu (RP4-2-Länge, Mu-Verlust)

Abb. 19 : Charakterisierung von RP4-2-Rep Mutanten (4):

Plasmidanalysen von Rep-Revertanten

Die Lysatanalysen der Stämme mit den in der Tabelle aufgeführten Mutanten bzw. Revertanten werden in D.III.2. ausführlich diskutiert. In der Spalte Bemerkungen ist hiervon eine kurze Zusammenfassung gegeben.

Neben den eigentlichen Lysaten sind zum Vergleich die Stellen markiert, wo die drei Kontroll-Plasmide bandieren würden.

Abb.19 Test Nr.8 : Was die Plasmidlänge betrifft, kann für Rep3-E die Theorie bestätigt werden, daß die Mu-Insertion exakt rückgängig gemacht werden kann.

Analoge Plasmidanalysen werden in Kapitel D.III.3, diskutiert, wenn Transconjuganten aus Kreuzungen von Rep-Donoren mit plasmidfreien (= nicht complementierenden) Rezipienten untersucht werden.

Zum Abschluß der Experimente mit Rep-Plasmid-Revertanten soll noch der Nachweis der Hfr-Eigenschaft eines RepX-A Stammes erbracht werden.

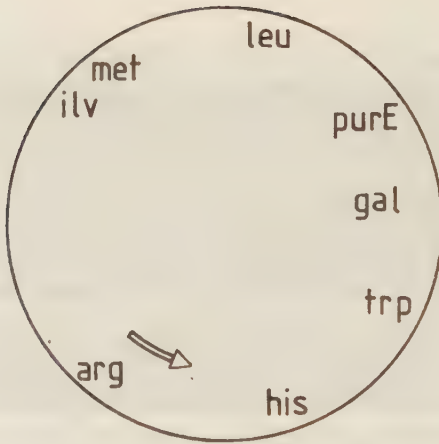
Die genetischen Tests von Revertanten der Klasse A zeigten, daß die RP4-2::Mu Plasmide nicht mehr effektiv (d.h. im Stempeltransferverfahren nicht nachweisbar) transferiert werden, obwohl alle Marker der Plasmide vorhanden sind. Die Interpretation, daß die Plasmid-Moleküle im Chromosom integriert vorliegen, ließ vermuten, daß damit in Analogie zum E.coli F-System neue Hfr-Stämme entstanden sind.

Die Frage, ob RP4-2 das E.coli Chromosom mobilisieren kann, wurde an einem Beispiel untersucht.

Abb.20 zeigt die Ergebnisse einer Kreuzung von Rep1-A-8 mit dem mehrfach auxotrophen Rezipienten S444-2 (Mu_{cts} , Nx). Mu_{cts} im Rezipienten soll mögliche zygotische Induktion verhindern, Nx-Resistenz dient zur Selektion gegen den Donor. Nach Selektion auf den entsprechenden Minimalmedien wurden die in der Tabelle der Abb.20 aufgeführten Rekombinationsfrequenzen gefunden.

Die Ausbeute an Rekombinanten ist für den Marker arg am höchsten und nimmt über ilv, met und leu ab.

Damit ist der Beweis erbracht, daß RP4 in der Gegend von arg integriert ist und das Wirtschromosom in der in Abb.20 gezeigten Weise mobilisiert.



Selektion auf	arg	ilv	met	leu	purE, gal trp, his
Rekombinanten pro Donor	3×10^{-3}	6×10^{-5}	$1,4 \times 10^{-5}$	4×10^{-7}	$> 2 \times 10^{-8}$

Abb. 20 : Charakterisierung von RP4-2-Rep-Mutanten (5):
Nachweis der Hfr-Eigenschaft eines Stammes
mit integriertem RP4-2::Mu Plasmid (Rep1-A8)

Die Kreuzung kann wie folgt beschrieben werden :

Donor : S3032-111 (Rep1-A8, pSR100)

Rezipient : S444-2 (Mu_{cts} , Nx^{r} , auxotroph für die in der
Zeichnung angegebenen Marker)

5×10^7 Donorzellen wurden mit 2×10^8 Rezipientenzellen
gemischt und 3 Stunden bei 30°C auf Festmedium inkubiert.
Das Kreuzungsgemisch wurde auf AmNx-Medium mit den
entsprechenden Zusätzen selektioniert.

In der Tabelle sind die hierbei gefundenen Rekombi-
nationsfrequenzen aufgeführt.

Zusatzinformationen :

- keiner der Resistenzmarker des Donors (Ap, Km, Tc)
wurde übertragen ($> 2 \times 10^{-8}$);
- in Kontroll-Kreuzungen mit RP4-2 oder RP4-2::Mu
Stämmen war kein Gentransfer nachweisbar.

(E.coli-Karte nach Miller; 42)

III.3. Kreuzungsexperimente mit RP4-2-Rep⁺Mu Mutanten

Die bisher angewandte Methode der Stempelkreuzung war gut geeignet, eine große Anzahl von Kolonien in kurzer Zeit auf ihre Donoreigenschaften zu testen. Die Auswertung der Transconjuganten-Selektionsplatten erlaubte es jedoch nur zu entscheiden, ob Plasmid-transfer möglich war oder nicht. Über die Höhe von Transferfrequenzen konnte bisher keine Aussage gemacht werden. Die folgenden Untersuchungen sollten diese Lücke schließen.

Neben einem Kontroll-Plasmid (RP4-2::Mu, Km^rTc^rTra⁺) wurden alle 11 Rep-Mutanten mit 6 verschiedenen Rezipienten unter optimalen Bedingungen gekreuzt und die Kreuzungen quantitativ ausgewertet. Der Einsatz der 6 Rezipientenstämme läßt sich wie folgt begründen:

In S302-20 kann keine Transcomplementation von Rep-Mutanten erfolgen. Transconjuganten können hier nur mit Rep-Revertanten entstehen.

S302-30(pSR100) enthält den Transcomplementationspartner für Replikations-defekte RP4-2 Mutanten. Mit diesem Rezipienten waren die höchsten Transferfrequenzen zu erwarten.

S302-40(pSR120) : aufgrund der bisherigen Erfahrungen (vgl. D.I.1.2.1.) war zu erwarten, daß pSR120 die Aufnahme von RP4-2 Mutanten stark behindert. Die Frage blieb bisher offen, ob Rep-Plasmide zusammen mit pSR120 stabil repliziert werden können.

S302-50(RP4-5-4) : das miniRP4-Derivat RP4-5-4 wurde bereits einmal in den Stempeltransfereperimenten eingesetzt (vgl. Abb.14). Hier soll getestet werden,

welche der 11 Rep-Plasmide sowohl von pSR100 als auch von RP4-5-4 complementiert werden können.

S302-70(R751): R751 ist wie RP4 ein Plasmid der Incompatibilitätsklasse P (43), sollte daher ein ähnliches wenn nicht identisches Replikationssystem wie RP4 besitzen. Die Kreuzungstests mit R751 als Rezipienten-Plasmid sollten die Frage beantworten, ob auch R751 Replikations-defekte RP4-2 Mutanten complementieren kann.

S302-80(RP4-7) : Die Frage lautete hier, ob die starke Incompatibilität zwischen RP4-Derivaten die Etablierung eines theoretisch möglichen Trans-complementationssystems (RP4-7/RP4-2-Rep) zulassen würde.

In Tab.13 sind die Transferfrequenzen der durchgeführten Kreuzungen zusammengefaßt.

Tab.13 Test Nr. 12 ist die Kontrollkreuzung mit RP4-2::Mu, wobei Mu in einem nicht-essentiellen Bereich von RP4-2 inseriert ist. 100% betragen die Transferfrequenzen mit den Rezipienten S302-20 und S302-30(pSR100). In der Tabelle wurde hierfür der Wert "1" eingesetzt. RP4-5-4 im Rezipienten (S302-50) behindert die Aufnahme nur unwesentlich. Dagegen vermindert R751 (S302-70) und RP4-7 (S302-80) die Transferfrequenz auf 10^{-3} , was auf die Eigenschaft "surface exclusion" dieser Plasmide zurückzuführen ist.

Die Test Nummern 1 bis 11 der Tab.13 zeigen die Kreuzungen mit den Rep-Plasmiden. Die entsprechenden Donorkulturen wurden aus frisch isolierten Mikrokolonien angezogen.

	Donor- Plasmide	Rezipienten					
		S302-20 -	S302-30 (pSR100)	S302-40 (pSR120)	S302-50 (RP4 5-4)	S302-70 (R 751)	S302-80 (RP4-7)
1	Rep 1	10^{-3}	10^{-1}	10^{-5}	10^{-1}	$<10^{-5}$	5×10^{-5}
2	Rep 2	10^{-4}	1	10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}	10^{-2}
3	Rep 3	10^{-3}	1	5×10^{-5}	5×10^{-5}	10^{-5}	5×10^{-2}
4	Rep 4	10^{-2}	1	10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}	10^{-2}
5	Rep 5	10^{-5}	10^{-1}	$<10^{-5}$	10^{-1}	10^{-5}	10^{-3}
6	Rep 6	10^{-3}	1	10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}	10^{-2}
7	Rep 7	10^{-3}	1	10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}	10^{-2}
8	Rep 8	10^{-4}	1	10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}
9	Rep 9	10^{-5}	10^{-1}	10^{-5}	$<10^{-5}$	10^{-5}	10^{-5}
10	Rep10	10^{-5}	1	10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}	10^{-4}
11	Rep11	10^{-4}	1	10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}	10^{-2}
12	RP4-2::Mu	1	1	10^{-4}	10^{-1}	10^{-3}	10^{-3}

Tab. 12 : Charakterisierung von RP4-2-Rep Mutanten (6):
Kreuzungsverhalten von Rep-Mutanten mit
verschiedenen Rezipienten.

Die Kreuzungen wurden nach der in C.III.1. beschriebenen Methode durchgeführt. Die Ergebnisse werden in D.III.3 ausführlich diskutiert.

Rezipient S302-30(pSR100):

Die Transferfrequenzen erreichen mit dem Rezipienten S302-30(pSR100) Werte zwischen 1 und 10^{-1} .

Rep-Plasmide haben demnach keine Schwierigkeiten, in einem Rezipienten etabliert zu werden, der die benötigten Genprodukte enthält.

Rezipient S302-20 :

Mit dem Plasmid-freien Rezipienten S302-20 liegen die Transferfrequenzen durchwegs signifikant niedriger als mit S302-30(pSR100), z.B. um den Faktor 10^2 bei Kreuzung 4 oder sogar 10^5 bei Kreuzung 10.

Rep-Mutanten könnennicht in S302-20 replizieren, in den wenigen Transconjuganten dieser Kreuzungen müssen demnach Revertanten der ursprünglichen RP4-2-Rep::Mu Donor-Plasmide enthalten sein. Plasmidanalysen dieser Stämme werden anhand der folgenden Abbildungen (21, 22 und 23) besprochen.

Rezipient S302-40(pSR120) :

pSR120 sollte theoretisch die Rep-Mutationen complementieren können, da die RP4-spezifischen Sequenzen dieses Plasmides identisch sind mit pSR100. Die Transferfrequenzen liegen jedoch in allen Fällen noch unter denen der Kreuzung mit S302-20. Die Testkreuzung (Nr.12) zeigt, daß pSR120 die Etablierungswahrscheinlichkeit von RP4-2::Mu um den Faktor 10^4 vermindert. Die niedrigen Transferfrequenzen mit Rep-Plasmiden könnte ähnliche Ursachen haben. Die Frage, ob in den seltenen Transconjuganten nun beide Plasmide (RepX und pSR120) vorliegen und ein Transcomplementationssystem bilden, wird in den folgenden Plasmidanalysen der Abb.21, 22 und 23 untersucht.

Rezipient S302-50(RP4-5-4):

In Kap. D.II.3.4. wurde nach Stempeltransferexperimenten bereits festgestellt, daß es Rep-Mutanten gibt, die zwar von pSR100, nicht aber von RP4-5-4 complementiert werden. Die ausführlichen Kreuzungen der Tab.13 zeigen, daß unter den 11 Rep-Mutanten nur zwei mit hoher Frequenz nach S302-50(RP4-5-4) transferiert werden können (Rep1 und Rep5). Die anderen 9 Plasmide werden entweder nicht complementiert oder sie haben in diesem Rezipienten Etablierungsschwierigkeiten.

Rezipient S302-70 (R751):

Die Transferfrequenzen sind in allen Kreuzungen zwischen Rep-Plasmid-Donoren und R751-Rezipienten niedriger als in der Kontrollkreuzung mit einem normalen RP4-2::Mu Plasmid. Auch hierfür gibt es zwei Erklärungsmöglichkeiten: entweder kann R751 die Rep-Mutationen nicht complementieren oder Inkompatibilität verhindert die gemeinsame Replikation beider Plasmide in einer Zelle.

Rezipient S302-80 (RP4-7) :

Nach den Inkompatibilitätsversuchen (D.I.3.3.) waren zwischen RP4-7 und RP4-2::Mu Plasmiden starke, und im Gegensatz zur Situation mit pSR100, symmetrische Verdrängungsreaktionen zu erwarten. In einigen Fällen (z.B. Kreuzung 3) deuten die hohen Transconjugantentiter trotzdem auf ein effektiv etabliertes Trans-complementationssystem hin. In anderen Beispielen wurden sehr niedrige Transferfrequenzen gefunden (z.B. Kreuzung 1 und 8). Alle Transconjuganten der genannten Beispiele erwiesen sich als außerordentlich instabil, d.h. die Resistenzmarker beider Plasmide (Rep: Tc^r, RP4-7: Tp^r) waren nicht stabil in einem Klon zu halten.

Die Ergebnisse der Kreuzungen der Tab.13 lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- 1) Die Eigenschaft Rep⁻ wurde für alle 11 untersuchten Mutanten bestätigt, da die Transferfrequenzen mit S302-30(pSR100) wesentlich höher liegen als mit dem Plasmid-freien Rezipienten S302-20.
- 2) Mit S302-40(pSR120) sind die Transferfrequenzen noch niedriger als mit S302-20.
- 3) Von RP4-5-4 in S302-50 werden nur die Mutanten Rep1 und Rep5 complementiert.
- 4) Das P-Typ-Plasmid R751 kann entweder keine der Rep-Mutanten complementieren oder Incompatibilität der Plasmide verhindert deren gleichzeitige Replikation in einer Zelle vollständig.
- 5) Theoretisch sollten alle Rep-Mutanten von RP4-7 complementierbar sein, oder, falls Incompatibilität dies verhindert, sollten die Transferfrequenzen überall gleich niedrig sein. Die Kreuzungen mit S302-80(RP4-7) ergaben jedoch kein einheitliches Bild. Transconjuganten aus solchen Kreuzungen waren darüberhinaus äußerst instabil.

Einige Transconjugantenkolonien wurden im folgenden einer Plasmidanalyse unterworfen. Es ging hierbei vor allem um die Frage, wie die Plasmidmuster der Transconjuganten von Rep-Mutanten mit S302-20 und S302-40(pSR120) aussehen. In S302-20 dürften, wie erwähnt, nur Rep-Revertanten zu finden sein. In S302-40 (pSR120) war es fraglich, ob nach Überwindung der in der Tab.13 dokumentierten Etablierungsschwierigkeiten von Rep-Plasmiden ein funktionierendes Transcomplementationssystem möglich ist.

III.4. Transconjugantenanalysen der Kreuzungen mit Rep-Donoren

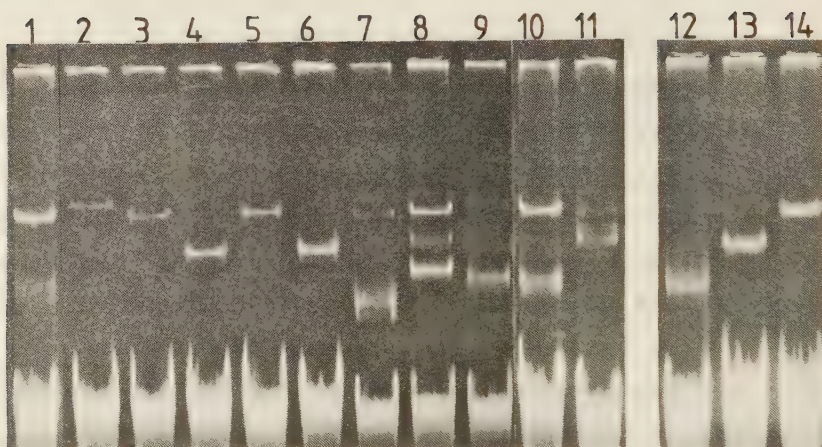
A). Kreuzungen mit Rep-1 Donoren

Abb.21 zeigt die im Agarosegel aufgetrennten Rohlysate folgender Stämme (vgl. Tab. in Abb.21).

Abb.21 Test Nr. 12, 13 und 14 sind die Kontrollen zur Abschätzung der Plasmidlängen der übrigen Stämme.

Abb.21 Test Nr. 1 ist der Donorstamm mit Rep1 und pSR100. Von diesem Donor stammen die Transconjuganten ab, die in den übrigen Spalten aufgetragen sind.

Abb.21 Test Nr. 2, 3 und 4 enthalten Beispiele für Rep1-Revertanten, d.h. Rep-Plasmid-Derivate, die in S302-20 ohne die Hilfe von pSR100 replizieren. Die drei gezeigten Längenklassen wurden in wechselnden Zahlenverhältnissen beim Nachtest von S302-20-Transconjuganten gefunden. Die Marker dieser Plasmide wurden nicht näher untersucht. Bezüglich der Plasmidlängen könnten sie in die Aufstellung der Tab.10 bzw. der Abb.19 eingefügt werden. Plasmid Rep1-21 (Abb.21/2), das deutlich länger ist als RP4-2::Mu entspräche demnach einem "Cointegrat" (vgl. Rep6-B, Abb.19 Nr.5). Plasmid Rep1-22 (Abb.21 Nr.3) besitzt normale RP4-2::Mu Länge und könnte der Revertantenklasse B oder C zugehören. Plasmid Rep1-23 (Abb.21 Nr.4) hat wieder RP4-2 Länge und entspricht demnach RepX-E Revertanten. Im Gegensatz zu den in Tab.11 gezeigten Ergebnissen (dort wurde Rep1 als sehr stabil gefunden) wurden bei den hier beschriebenen Kreuzungen also auch von Rep1 Revertanten verschiedener Klassen gefunden. Die Test Nr. 5 bis 9 der Abb.21 zeigen Beispiele für Transconjuganten aus Kreuzungen mit S302-40(pSR120).



Test Nr	Stamm Nr	Plasmide im Gel	Rezipient Nr	ursprüngl. Rez.Plasmid
1	S3032-111	Rep1 + pSR100	-	-
2	S121	Rep1-21	S302-20	-
3	S122	Rep1-22	S302-20	-
4	S123	Rep1-23	S302-20	-
5	S141	Rep1-41	S302-40	pSR120
6	S142	Rep1-42	S302-40	pSR120
7	S143	Rep1 + pSR1213	S302-40	pSR120
8	S144	Rep1 + pSR1214 + (?)	S302-40	pSR120
9	S145	pSR120	S302-40	pSR120
10	S151	Rep1 + RP4/5-4	S302-50	RP4/5-4
11	S181	Rep1 + RP4-7 + (?)	S302-80	RP4-7
12	S302-30	pSR100	-	-
13	S302-90	RP4-2	-	-
14	S302-9	RP4-2::Mu	-	-

Abb. 21 : Charakterisierung von RP4-2-Rep Mutanten (7a):
Transconjuganten aus Kreuzungen mit Rep1

Die Lysatanalysen werden in D.III.3.A besprochen.
Die Abbildung enthält in Pos. 12-14 die Original-
Lysate von Kontroll-Stämmen.

In keinem Fall wurden Rep1 + pSR120 unverändert in einem Klon gefunden. Es traten dagegen wieder Rep-Revertanten der bekannten Längen auf :

Rep1-41 (Abb.21 Nr.5) entspricht Rep1-22 und Rep1-42 (Abb.21 Nr.6) ist wieder eine Rep1-E Revertante.

Die Test Nr. 7 und 8 der Abb.21 zeigen, daß auch mit pSR120 Veränderungen auftreten können, die dann offenbar die Anwesenheit von Rep1 ermöglichen.

Im Stamm S143 (Abb.21 Nr.7) findet sich ein verkürztes pSR120-Derivat (pSR1213); die obere Bande in dieser Probe könnte Rep1 sein, das von pSR1213 offenbar complementiert werden kann.

Im Stamm S144 (Abb.21 Nr.8) wurde aus pSR120 durch leichte Verlängerung das Plasmid pSR1214. Auch dieses Derivat kann Rep1 complementieren. Die Zwischenbande in dieser Probe (etwas länger als RP4-2) wurde bisher nicht geklärt.

Integration von Rep1 in einem S302-40(pSR120)-Rezipienten scheint eine weitere Möglichkeit zu sein, die Unverträglichkeit der beiden Plasmide zu überwinden.

Abb.21 Nr.9 (Stamm S145) ist ein Beispiel dafür.

pSR120 ist als freies Plasmid in unveränderter Länge vorhanden. Rep1 ist integriert, was neben der Km-Resistenz der Zellen auch dadurch bewiesen werden kann, daß S145 in der Lage ist, pSR120 sehr effektiv zu transferieren. Hierbei kann es sich nur um Mobilisierung von pSR120 durch das integrierte Rep1 Plasmid handeln.

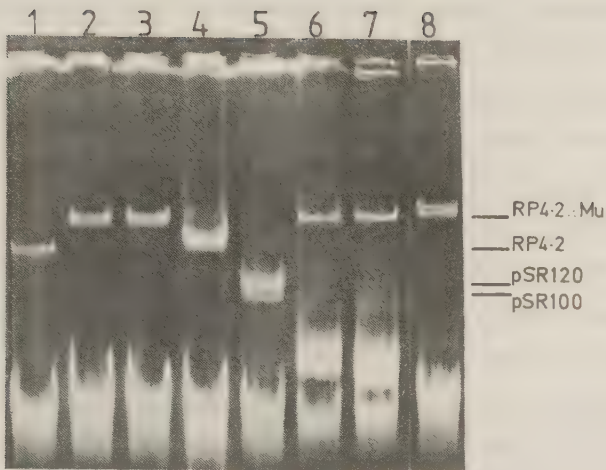
Abb.21 Nr.10 zeigt die Plasmidverhältnisse in dem Transcomplementationssystem Rep1/RP4-5-4; beide Plasmide liegen bezüglich ihrer Plasmidlängen unverändert vor.

Abb.21 Nr.11 zeigt ein Lysat, in dem RP4-7, Rep1 und ein unbekanntes Derivat eines von beiden Plasmiden enthalten ist. S302-80(RP4-7) Transconjuganten erwiesen sich als äußerst instabil und es ist sehr wahrscheinlich, daß das in Abb.21 Nr.11 gezeigte Rohlysat ein Gemisch aus verschiedenen Segreganten-Stämmen ist.

B) Kreuzungen mit Rep-3 Donoren

Abb.22 zeigt Transconjuganten aus Kreuzungen mit Rep3. Die Revertanten, die in S302-20 gefunden wurden, entsprechen längenmäßig Rep3-E bei Plasmid Rep3-21 (=RP4-2-Länge, Abb.22 Nr.1) bzw. Rep3-B oder Rep3-C im Fall von Rep3-22 (=unveränderte RP4-2::Mu-Länge, Abb.22 Nr.2). Rep3-E kann auch in S302-40(pSR120) gefunden werden (Rep3-42, Abb.22 Nr.4); pSR120 wurde aus diesen Stämmen verdrängt.

Abb.22 Nr.5 zeigt wieder ein Beispiel für Integration eines Rep-Plasmids. Auch aus diesem Stamm wird pSR120 sehr effektiv mobilisiert. In den Stämmen S344 und S345 (Abb.22 Nr.6 und 7) wurden stark verkürzte pSR120-Derivate gefunden. Die Plasmide pSR1234 und pSR1235 dieser Stämme sind echte multicopy Plasmide, was aus der Intensität der Plasmid-DNA-Bande ersichtlich ist. Sie replizieren daher höchstwahrscheinlich über das im ursprünglichen pSR120 vorhandene ColE1-Replikationssystem. Daneben besitzen sie mindestens noch soviel RP4-spezifische Sequenzen, daß Rep3 (repräsentiert durch die obere Bande in Abb.22 Nr.6 und 7) trans-complementiert werden kann. Besonders zu erwähnen ist, daß in den Spalten 6 und 7 der Abb.22 ca. 3xweniger DNA aufgetragen wurde als üblich, erkennbar auch an der schwächeren Intensität der chromosomalen Bande.



Test Nr	Stamm Nr	Plasmide im Gel	Rezipient Nr	ursprüngl. Rez.Plasmid
1	S321	Rep3-21	S302-20	-
2	S322	Rep3-22	S302-20	-
3	S341	Rep3-41	S302-40	pSR120
4	S342	Rep3-42	S302-40	pSR120
5	S343	pSR120	S302-40	pSR120
6	S344	Rep3 + pSR1234	S302-40	pSR120
7	S345	Rep3 + pSR1235	S302-40	pSR120
8	S381	Rep3(?)	S302-80	RP4-7

Abb. 22 : Charakterisierung von RP4-2-Rep Mutanten (7b):
Transconjuganten aus Kreuzungen mit Rep3

Die Lysatanalysen werden in D.III.3.8 besprochen.
Die Kontroll-Plasmide sind schematisch eingezeichnet.
In Pos. 6 und 7 wurden nur 5µl aufgetragen, während die anderen Proben 15µl Lyset enthalten.

Trotzdem sind die Rep-Plasmid-Banden stärker als in einem Rep-3-Stamm. Daraus könnte auf eine Erhöhung der Kopienzahl von Rep3 in den Stämmen S344 und S345 geschlossen werden.

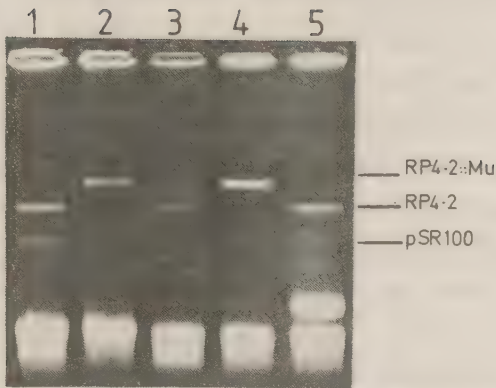
Es wurde zusätzlich versucht, gereinigte DNA der Plasmide pSR1234 und pSR1235 zu transformieren. Weder Ap- noch Tc-Selektion führte zu Transformanten. Die RP4-spezifischen Resistenz-Marker des ursprünglichen Plasmids pSR120 sind also in den mini-Derivaten nicht mehr vorhanden.

Abb.22 Nr.8 zeigt das Lysat eines Transconjuganten aus der Kreuzung Rep3 mit S302-80(RP4-7). Die Transferfrequenz dieser Kreuzung ist zwar hoch (vgl. Tab.13/3), die Transconjuganten sind aber sehr instabil. Das Gelbild beweist, daß keine normale Transcomplementation der beiden Plasmide besteht. Neben Rep3 ist noch ein etwas längeres Plasmid zu erkennen, nicht aber das ursprünglich vorhandene Plasmid RP4-7.

C) Kreuzungen mit Rep-8 Donoren

Rep8 war das einzige RP4-2-Rep⁻ Plasmid der Testreihe, das keine Mu-Insertion mehr besitzt und wahrscheinlich aufgrund einer Mu-induzierten kleinen Deletion Replikations-defekt ist (vgl. Abb18 und Abb.23 Nr.1).

Auch von Rep8 lassen sich Revertanten nach Kreuzung mit S302-20 isolieren. Dabei wurden zwei Längenklassen gefunden. Rep8-21 und Rep8-41 (Abb.23 Nr. 2 und 4) sind stark verlängerte Derivate von Rep8. Die Länge der Plasmide entspricht der von RP4-2::Mu. Cointegrierte Rep8::pSR100 weisen theoretisch genau diese Länge auf, deren Existenz ist damit sehr wahrscheinlich gemacht.



Test Nr	Stamm Nr	Plasmide im Gel	Rezipient Nr	ursprüngl. Rez.Plasmid
1	S3032-111	Rep8 + pSR100	-	-
2	S821	Rep8-21	S302-20	-
3	S822	Rep8-22	S302-20	-
4	S841	Rep8-41	S302-40	pSR120
5	S843	Rep8 + pSR1283	S302-40	pSR120

Abb. 23 : Charakterisierung von RP4-2-Rep Mutanten (7c):
Transconjuganten aus Kreuzungen mit Rep8

Die Lysatanalysen werden in D.III.3.C besprochen.

Die Herkunft der deutlich erkennbaren, starken Bande unterhalb der chromosomalen DNA in Pos.1 konnte bisher nicht geklärt werden. Es handelt sich sicher nicht um ringförmig geschlossene Plasmid-DNA, denn im CsCl-EtBr-Dichtegradienten werden aus diesem Stamm nur Rep8 und pSR100 gewonnen.

Das Plasmid Rep8-22 (Abb.23 Nr.3) ist eine Revertante ohne Veränderung der Plasmidlänge. Ihre Entstehung könnte durch Sekundärmutation im Plasmid erklärt werden analog der Situation bei RepX-C (vgl. Tab10 und Abb.19). Nach Kreuzung von Rep8 mit S302-40(pSR120) wurde wie in den vorhergehenden Beispielen (vgl. Abb.22 Nr.6 u.7) wieder ein stark verkürztes multicopy Derivat von pSR120 gefunden (pSR1283, Abb.23 Nr.5), das Rep8 offenbar problemlos transcomplementiert.

Im Überblick wurden aus den Plasmidanalysen der Rep-Transconjuganten folgende Erkenntnisse gewonnen. In den Rezipienten S302-20 und S302-40 wurden Revertanten der verwendeten Rep-Donor-Plasmide gefunden, die ohne die Hilfe von pSR100 replizieren. Diese Revertanten lassen sich in drei Längenklassen einteilen:

- a) verlängerte Plasmide, die am einfachsten mit der Annahme erklärt werden können, daß Cointegration von Rep mit pSR100 stattgefunden hat;
- b) längenmäßig unveränderte Plasmide, die durch Sekundärmutation entstanden sein könnten, die die Plasmide phänotypisch wieder Rep⁺ erscheinen läßt;
- c) Revertanten mit der Länge des Ausgangsplasmids RP4-2, bei denen die Mu-Insertion offenbar fehlerfrei rückgängig gemacht wurde.

Analoge Ergebnisse lieferten bereits die Plasmidtests der Rep-Plasmid-Revertanten in den ursprünglichen Wirtszellen, d.h. ohne Transfer der Plasmide (vgl. Abb.19).

Aus Kreuzungen mit S302-40 wurden pSR120-Derivate isoliert, die im Gegensatz zum Ausgangsplasmid mit Rep-Mutanten relativ stabil repliziert werden und diese daher effektiv transcomplementieren können. Prinzipiell wurden zwei Veränderungen von pSR120 gefunden : spontane Verlängerung oder Deletion. pSR1214 (Abb.21 Nr.8) ist ein Beispiel für pSR120-Verlängerung. pSR1213 (Abb.21 Nr.7) ist ein verkürztes Derivat, das keine Erhöhung der Kopienzahl aufweist. pSR1234, pSR1235 und pSR1283 (Abb.22 Nr.6 und 7 und Abb.23 Nr.5) sind Beispiele für pSR120-Mutanten mit großen Deletionen und sehr hoher Kopienzahl.

Die Unverträglichkeit von pSR120 und RP4-2-Plasmiden führt außerdem dazu, daß sehr häufig Integration von Rep-Mutanten nachgewiesen werden kann. Die in solchen Stämmen unverändert vorliegenden pSR120-Plasmide sind mit hoher Frequenz mobilisierbar.

III.5. Wachstumseigenschaften von Stämmen mit Rep-Plasmiden

Die Eigenschaft von Stämmen, Mikrokolonien zu bilden, wurde bereits an mehreren Stellen der Arbeit erwähnt. Das erste mal fielen solche Kolonien auf, als pSR100 mit RP4-2 Plasmiden in einem Stamm durch Transduktion zusammengebracht wurden (vgl. D.I.3.5.).

Im Verlauf der dort beschriebenen Incompatibilitäts-experimente zeigte es sich, daß pSR100 RP4-2 schlecht verdrängen kann und daß Zellen mit beiden Plasmiden Mikrokolonien bildeten, d.h. sehr langsam wuchsen bzw. in ihrer Zellteilungsfähigkeit beeinträchtigt waren. Letzteres konnte auch durch den Nachweis von Zellfilamenten in solchen Kolonien demonstriert werden (vgl. Abb.6).

In Tab.13 sind die Generationszeiten von Stämmen mit den Mutanten Rep1 und Rep3, einigen ihrer Revertanten sowie von Kontroll-Stämmen zusammengestellt.

Die untersuchten Stämme wurden, ausgehend von frisch isolierten Einzelkolonien, in Flüssigkultur unter nicht-selektiven Bedingungen angezogen. Die Inkubations-temperatur betrug 32°C. Die Stämme sind isogen, sie leiten sich alle von S302-20 ab und unterscheiden sich nur in ihrem Plasmidgehalt.

Die Generationszeit von S302-20 beträgt unter den angewandten Bedingungen 45 min. Die Anwesenheit von RP4-Derivaten (pSR100, pSR120, RP4-2 oder RP4-2::Mu) ändert daran nichts (vgl. Tab.13 Nr. 13 bis 17).

Der Stamm S302-95 war von besonderem Interesse, da er zwei Plasmide zu vermehren hatte : RP4-2 und das F-Plasmid F'lac::Tn1. Die Generationszeit dieses Stammes ist nicht nachweisbar länger, als die des Plasmid-

Test Nr.	Stamm Nr.	Plasmide	Gen. zeit (min)
(1)	S131	Rep1 + pSR100	66
2	S121	Rep1-21	48
3	S122	Rep1-22	48
4	S123	Rep1-23	48
5	S143	Rep1 + pSR1213	45
6	S144	Rep1 + pSR1214	66
7	S151	Rep1 + RP4 5-4	69
(8)	S331	Rep3 + pSR100	78
9	S321	Rep3-21	48
10	S322	Rep3-22	48
11	S343	(Rep3 _{int}) pSR120	48
12	S344	Rep3 + pSR1234	54
13	S302-20	-	45
14	S302-30	pSR100	45
15	S302-40	pSR120	45
16	S302-90	RP4-2	45
17	S302-91	RP4-2 Tra::Mu _c +	45
18	S302-95	RP4-2 + F' lac ::Tn1	48

Tab. 13 : Charakterisierung von RP4-2-Rep Mutanten (8):
Generationszeiten von Rep1-, Rep3- und
einigen Vergleichsstämmen

Die Stämme wurden ausgehend von frisch isolierten Einzelkolonien in RCM-Medium bei 32°C unter guter Belüftung angezogen. Die optischen Dichten der Kulturen (o.D. bei 650 nm) wurden gegen die Zeit aufgetragen und die Generationszeiten graphisch ermittelt.

freien Kontroll-Stammes; die Differenz von 3 min liegt im Bereich der Fehlergrenze. (Tab.13 Nr.18).

Der Stamm S131 (Rep1 + pSR100) wächst um 43% langsamer als die Kontrollen (Tab.13 Nr.1).

Wenn Rep1 von pSR1214, dem verlängerten pSR120-Derivat, complementiert wird, wächst der Stamm ebenso langsam (S144, Tab.13 Nr.6). Auch aus Complementation von Rep1 durch RP4-5-4 resultiert verlangsamtes Wachstum (S151, Tab.13 Nr. 7).

Stämme mit den Rep1-Revertanten, die in Abb.21 beschrieben wurden, wachsen normal schnell (S121, S122 und S123; Tab.13 Nr. 2-4). Die Complementation von Rep1 durch pSR1213 (=pSR120 Deletionsmutante) benachteiligt die Zellen auch nicht (Tab.13 Nr. 5).

Rep3 und pSR100 zusammen in einer Zelle verlangsamen die Generationszeit um 73% (Tab.13 Nr. 8).

Auch hier findet man wieder normale Wachstumsgeschwindigkeit von 45 min pro Generation, wenn Rep3 zu Rep⁺ Plasmiden revertierte (S321 und S322), bzw. im Chromosom integriert vorliegt (S343) (Tab.13 Nr. 9-11).

Eine geringfügige aber meßbare Verlangsamung der Zellteilungsgeschwindigkeit wird für S344 gefunden (Tab.13 Nr. 12), wo Rep3 durch pSR1234, der multicopy Deletionsvariante von pSR120, complementiert wird.

Es sei noch einmal darauf hingewiesen, daß in diesem Stamm die Kopienzahl von Rep3 ebenfalls erhöht scheint (vgl. Abb.22 Nr.6).

Zum Abschluß der Untersuchungen der Wachstumseigenschaften von Stämmen mit Rep-Plasmiden soll noch die Zellmorphologie dieser Stämme diskutiert werden.

Analog zu den Mikrokolonien, die bei Inkompatibilitäts-experimenten gefunden wurden, waren großvolumige Zellen und Zellfilamente zu erwarten, wenn ein Stamm zwei verschiedene RP4-Plasmide zu vermehren hatte.

Abb. 24 zeigt die mikroskopischen Aufnahmen von Zellen aus drei Testkolonien.

Stamm S131 enthält Rep1 und pSR100 (Abb.24 Nr.1).

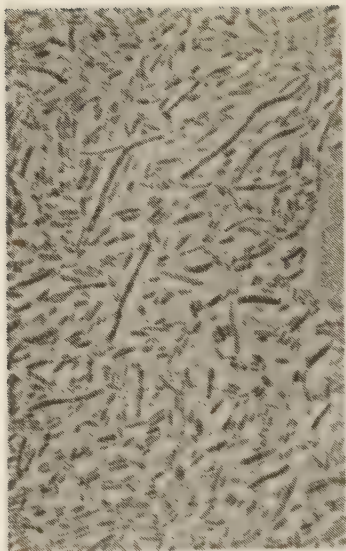
Die gezeigten Zellen stammen aus einer frisch isolierten Mikrokolonie.

In Stamm S331 replizieren die Plasmide Rep3 und pSR100 (Abb.24 Nr.2). Auch für diese Aufnahme wurde eine frische Mikrokolonie verwendet.

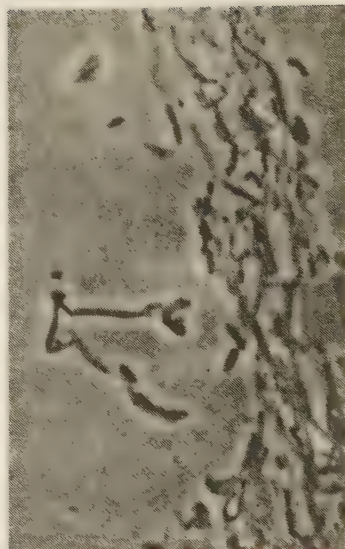
In beiden Bildern fallen die z.T. extrem langen Zellfilamente auf; die meisten der kürzeren Zellen sind außerdem deutlich dicker als normale E.coli Zellen.

Zum Vergleich sind in Abb.24 Nr.3 Zellen eines Stammes gezeigt, der die Revertante Rep1-21 enthält. Dieser Stamm wächst in Flüssigkultur normal schnell (vgl. Tab.13 Nr.2) und bildet auf Festmedium große Einzelkolonien. Die überwiegende Anzahl der Zellen besitzt die übliche E.coli-Morphologie. Filamente sind nur selten zu sehen.

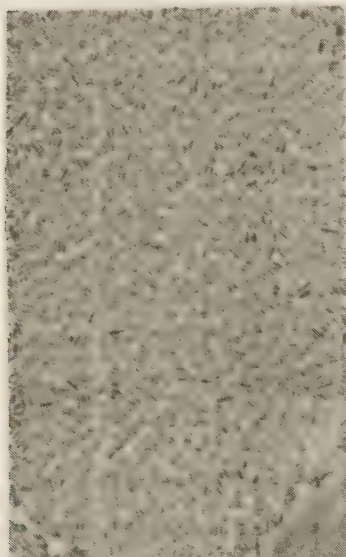
Die mikroskopischen Beobachtungen an den Stämmen S131 und S331 scheinen die Theorie zu bestätigen, daß Zellen, in denen RP4-2::Mu und pSR100 gleichzeitig replizieren müssen, in ihrer Teilungsfähigkeit stark behindert sind.



① S131 (Rep1 + pSR100)



② S331 (Rep3 + pSR100)



③ S121 (Rep1-21 Revert.)

Abb. 24 : Charakterisierung
von RP4-2-Rep Mutanten (9) :
Mikroskopische Untersuchung
von Einzelkolonien

Die Generationszeiten der ge-
zeigten Stämme können der
Tab.13 entnommen werden.
Die Zellmorphologie wird in
D.III.5. diskutiert.

D. IV. Kartierung von Transcomplementations- abhängigen RP4-Genen

Alle RP4-2-Rep Mutanten sind mit einer Ausnahme Mu-Insertionsmutanten mit oder ohne zusätzliche Deletion. In Rep8 liegt wahrscheinlich eine Mu-induzierte kleine Deletion in RP4-2 vor (vgl. Abb.18). Durch die Mu-Insertionen sind die mutierten Genorte physikalisch markiert. Im folgenden wird versucht, diese Markierungen mit zwei prinzipiell verschiedenen Methoden zu lokalisieren.

Eine erste Grobkartierung wurde mit Hilfe des Restriktionsenzym *SmaI* vorgenommen (D.IV.1.).

4 Rep-Mutanten wurden anschließend in Heteroduplex-experimenten elektronenmikroskopisch kartiert (D.IV.2.).

IV.1. Sma-Kartierung von Rep-Mutanten

Die Auswahl des Restriktionsenzym *SmaI* zur Kartierung von RP4-2::Mu Plasmiden wurde aus zwei Gründen getroffen :

1. die *SmaI*-Karte von RP4 ist bekannt (13;35), und
2. das Mu-Genom wird von *SmaI* nicht geschnitten (44).

Durch Insertion von Mu-DNA in ein *Sma*-Fragment von RP4-2 verschwindet die entsprechende Bande im Agarosegel und es tritt ein wesentlich längeres *SmaI*-Spaltstück auf. Auf dieser Basis ließ sich eine erste Grobeinteilung der untersuchten Mutanten vornehmen.

In Abb.25 wird diese Einteilung anhand von *SmaI*-Spaltungen erläutert.

Die Kontrollspaltung wurde mit RP4-2 DNA durchgeführt (Abb.25.1.C). Die *SmaI*-Fragmente 1,2,3 und 4 sind auf dem Agarosegel zu erkennen. Fragment 5 konnte unter

SmaI -
① Restriktions-
analysen

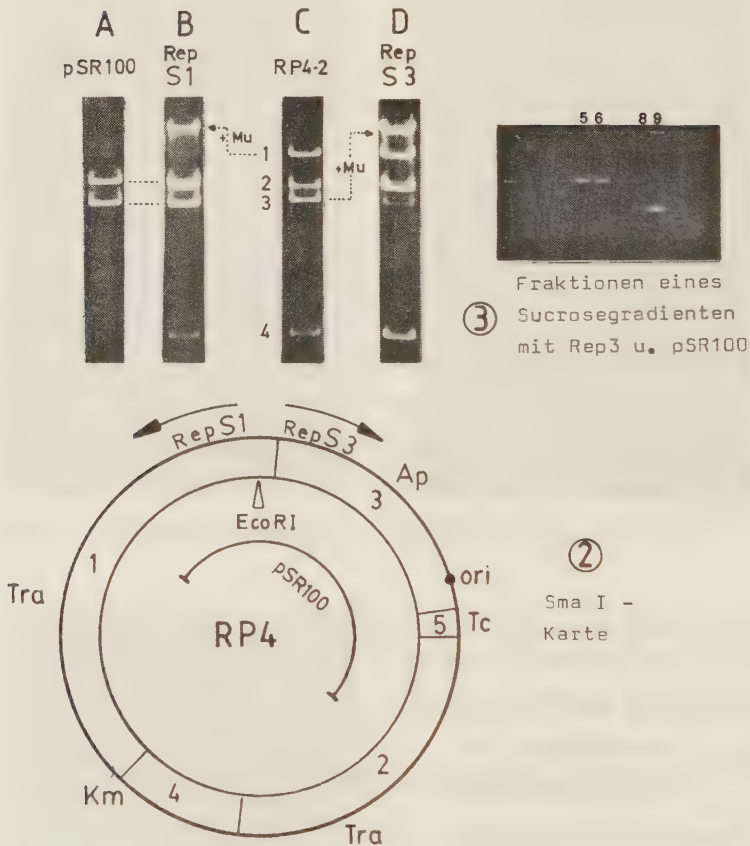


Abb. 25 : SmaI-Kartierungen von RP4-2-Rep::Mu Plasmiden

Die SmaI-Spaltungen wurden nach der in C.III.4.5. beschriebenen Methode durchgeführt.

Mit S1 (Spaltung B) und S3 (Spaltung D) sind die von Mu getroffenen RP4-2 Sma-Fragmente bezeichnet (1). Aus der Übersichtskarte (2) ist die Anordnung der einzelnen Sma-Fragmente in RP4 und pSR100 ersichtlich. Für Spaltungen von Rep-Mutanten der Klasse S3 wurde die pSR100 DNA durch Sucrosegradientenzentrifugation entfernt (3). Die Fraktionen 5 und 6 enthalten RP4-2::Mu DNA (vgl. C.III.4.4.).

Die SmaI-Restriktionsanalysen werden in D.IV.1. diskutiert.

den angewandten Bedingungen nicht mehr identifiziert werden.

In Abb.25.2. ist eine RP4-Karte mit den einzelnen SmaI-Fragmenten gezeichnet.

Die RP4-2-Rep::Mu Plasmide lassen sich nun in zwei Gruppen einteilen. Diese wurden mit RepS1 und RepS3 bezeichnet, wobei S1 und S3 die von Mu getroffenen SmaI-Fragmente bedeuten.

Die Mu-Insertion in Sma1 läßt sich sehr leicht nachweisen (Abb.25.1.8.) Das Fragment Sma1 verschwindet, dafür tritt ein neues, sehr langes Spaltstück (Sma1::Mu) im Gel auf. Bei Spaltungen mit Plasmid-DNA der Gruppe RepS1 störte die Anwesenheit von pSR100 nicht, der bei Gewinnung von Rep-Plasmid-DNA notgedrungen mitisoliert wird. In Abb.25.1.A. ist dessen SmaI-Restriktionsmuster gezeigt. In pSR100 sind die Fragmente Sma1, 2 und 4 nicht mehr vorhanden. Aus Resten von Sma1 und 2 entsteht ein neues Fragment.

Fragment Sma3 ist in pSR100 und RP4-2 identisch. An dieser Stelle tritt daher im Gel eine Doppelbande auf, wenn ein Sma-geschnittenes Gemisch der DNA beider Plasmide aufgetrennt wird.

Zum zweifelsfreien Nachweis der Mu-Insertion in Fragment Sma3 von RP4-2 wurde daher pSR100 aus dem Plasmidgemisch durch Sucrosegradientenzentrifugation abgetrennt. Teil 3 der Abb.25 zeigt die Analyse der einzelnen Fraktionen eines solchen Sucrosegradienten in der Gelelektrophorese. Die Fraktionen 5 und 6 enthalten fast reine RP4-2::Mu DNA, pSR100 bandiert oberhalb davon in den Fraktionen 8 und 9.

Mit so gereinigter Plasmid-DNA wurden die Rep-Mutanten der Gruppe S3 identifiziert (Abb.25.1.D.). Die noch schwach vorhandene Bande Sma3 stammt wahrscheinlich von nicht vollständig entfernter pSR100-DNA. Der Hauptanteil des ursprünglichen Fragments Sma3 bandiert nach Mu-Insertion weiter oben im Gel.

Die SmaI-Restriktionsanalysen lieferten für die 11 Rep-Mutanten folgende zusammenfassende Ergebnisse. In zwei der 10 getesteten RP4-2::Mu Hybridplasmide ist die Mu-DNA in Fragment Sma3 inseriert (Rep3 und 4). Die Übrigen tragen die Mu-Insertion in Fragment Sma1. Auch Rep8, die wahrscheinlich Mu-freie RP4-2 Deletionsmutante) ließ sich mit SmaI-Restriktion charakterisieren. Durch die Deletion in Rep8 ging nämlich die Sma-Schnittstelle zwischen Fragment 1 und 3 verloren. Für den in der Diskussion (E.IV.2.) angestellten Vergleich der eigenen Rep-Gen-Kartierungen mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen ist es wichtig zu notieren, daß in keinem der getesteten Fälle Mu-Insertion in Fragment Sma2 von RP4 gefunden wurde. Genauere Kartierungen sind mit SmaI-Restriktionsanalyse nicht möglich.

In der Übersichtskarte der Abb.25.2. konnten daher die DNA-Regionen, in denen die in der vorliegenden Arbeit gefundenen essentiellen RP4-Gene liegen, nicht näher als mit den Pfeilen angedeutet definiert werden (RepS1 und RepS3).

Mit der im nächsten Abschnitt besprochenen Kartierungsmethode waren dagegen sehr viel genauere Ergebnisse zu erwarten.

IV.2. Heteroduplexexperimente zur Kartierung von RP4-2-Repl:Mu

Mit Heteroduplexanalysen lassen sich DNA-Insertionen und Deletionen sehr genau lokalisieren, vorausgesetzt, die getesteten Plasmide besitzen Strukturen, die im Renaturierungsbild als Orientierungspunkte verwendet werden können.

RP4-2 besitzt zwei solcher charakteristischer Strukturen, die ISR1-Insertion mit anschließender Deletion in Tn1 sowie Tn1 selbst. Zur groben Lokalisierung von ISR1 und Tn1 kann auch die in Abb.2 gezeigte Übersichtskarte dienen. In Abb.26 ist deren genaue elektronenmikroskopische Kartierung gezeigt.

Die Heteroduplexbilder zeigen Renaturierungshybride aus pSR120 und RP4-2. Aus Abb.2 ist bekannt, daß in pSR120 das ColE1-Plasmid in der EcoRI-Schnittstelle von pSR100 (miniRP4) inseriert vorliegt. Im Heteroduplex mit RP4-2 entsteht an dieser Stelle eine Insertionsschleife einzelsträngiger DNA, die die Länge von ColE1 aufweist und mit der die EcoRI-Schnittstelle als erster Orientierungspunkt festliegt (Abb.26.A ¹_↓).

In Heteroduplex A ist als zweite Struktur die für Tn1 typische Erscheinungsform markiert (Abb.26 A ²_↓).

Die nicht vollständig renaturierte Region entsteht dadurch, daß bei Abkühlung der hitze-denaturierten Plasmid-DNA zunächst die invers repetitiven Enden von Tn1 zusammenfinden. Sterische Effekte verhindern dann die vollständige Renaturierung mit der Tn1-Region des Partnermoleküls (5;45).

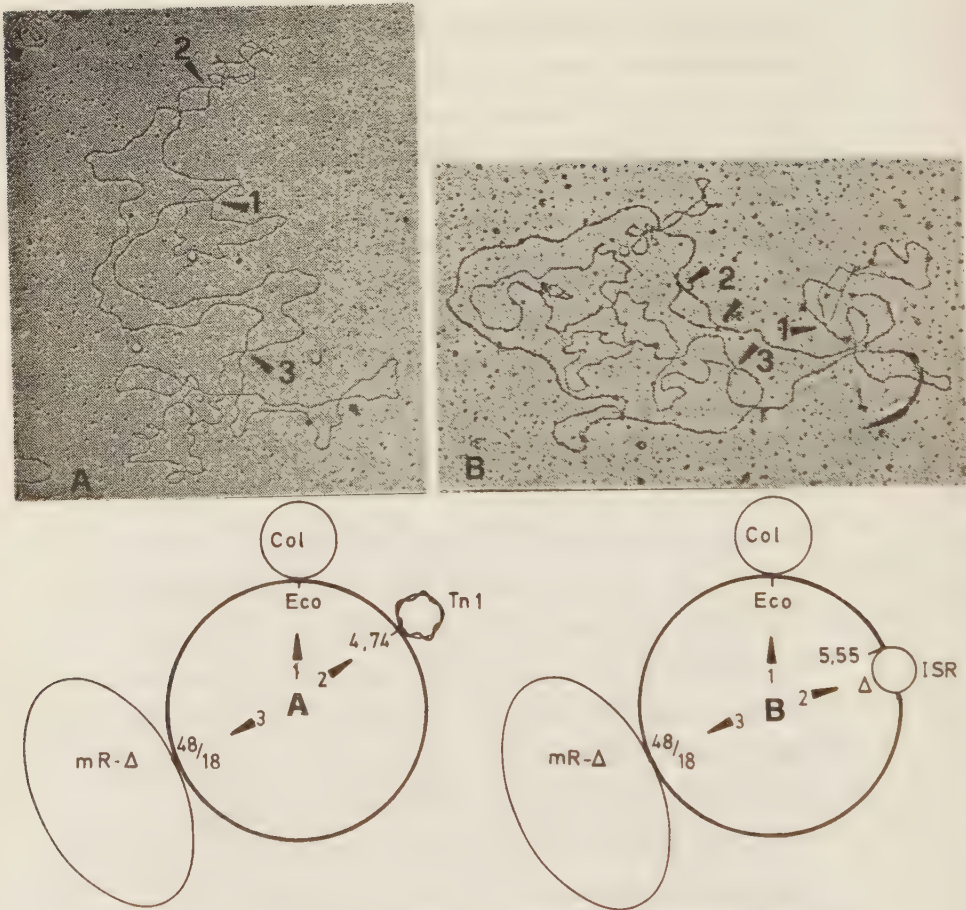


Abb. 26 : Heteroduplexstudien mit RP4-2 und pSR 120

Das ColE1-Plasmid (Col) ist in der EcoRI-Restriktionsstelle (Eco) von pSR100 inseriert (A und B ¹↓). Diese Stelle dient als Punkt 0 der in kb eingeteilten RP4-Karte.

Die miniRP4-Deletion (mR-Δ) umfaßt die RP4-Koordinaten 17,8 kb (18) bis 48,3 kb (48), in A und B markiert mit ³↓. In A ist Tn1 als partiell renaturierte Struktur zu erkennen (A ²↓). Heteroduplex B zeigt die ISR1-Insertionsstelle mit anschließender Deletion (Δ) in Tn1 von RP4-2 (B ²↓).

Die dritte einzelsträngige Region in Heteroduplex A entspricht dem RP4-DNA-Abschnitt, der dem pSR100 Molekül aufgrund seiner Deletion fehlt (Abb. 26.A ^{3↓}). In der Schemazeichnung wurde diese Region mit mR-Δ (= miniRP4-Deletion) bezeichnet.

Man setzt üblicherweise die (hier durch die ColE1-Insertion markierte) EcoRI-Schnittstelle als Punkt 0 und teilt die RP4-Karte davon ausgehend im Uhrzeigersinn in kb ein (kb = Kilobasen = 1000 Basenpaare). Aus Heteroduplex A lassen sich nach entsprechender Vermessung folgende Informationen gewinnen:

- a) Das Transposon Tn1 beginnt bei Punkt 4,74 kb auf RP4 (dies ist ein Mittelwert aus drei Messungen, die Standardabweichung betrug $\pm 0,12$ kb).
- b) Dem Plasmid pSR100 fehlt die DNA-Region zwischen den Koordinaten 17,82 kb und 48,3 kb (aus der Vermessung dreier Heteroduplexbilder ergab sich dabei eine Ungenauigkeit von $\pm 0,45$ kb).

Als Zusatzinformation wurde für diese Aussagen die bereits bekannte Molekülorientierung (d.h. daß Tn1 rechts von der EcoRI-Schnittstelle sitzt) verwandt (35).

Heteroduplex B der Abb. 26 zeigt das häufiger gefundene Renaturierungsmuster zwischen pSR120 und RP4-2.

ColE1-Insertion markiert auch hier die Schnittstelle von EcoRI (Abb. 26.B ^{1↓}). Analog zu Heteroduplex A findet man auch die miniRP4-Deletion (Abb. 26.B ^{3↓}).

Der Unterschied zu Heteroduplex A besteht darin, daß die Tn1-Region soweit wie möglich vollständig renaturiert vorliegt. Dadurch wird eine typische Blasenstruktur innerhalb von Tn1 sichtbar, die auf ISR1-Insertion und die daran anschließende Deletion zurückzuführen ist (Abb. 26.B ^{2↓}).

Die Koordinate 5,55 kb markiert demnach die Startstelle der Deletion in RP4-2 (Der aus drei Messungen ermittelte Wert kann um 0,19 kb davon abweichen).

Das Ziel der in Abb.26 zusammengefaßten Vorversuche war es, bezüglich der EcoRI-Schnittstelle (0 kb) die exakten Koordinaten für Tn1 sowie für die ISR1-Insertions-Deletions-Struktur festzulegen. Mit Hilfe dieser Orientierungspunkte wurden bisher vier RP4-2-Rep::Mu Plasmide in Heteroduplexexperimenten analysiert.

Abb. 27 zeigt zwei Beispiele solcher Untersuchungen. Plasmid-DNA der RP4-2 Mutanten Rep1 und Rep3 wurden mit RP4 hybridisiert. RP4 und RP4-2 unterscheiden sich durch die oben beschriebene Insertions-Deletions-Struktur in Tn1. Diese ist in den zwei gezeigten Heteroduplexmolekülen deutlich zu erkennen (Abb.27. A und B ). Die Entfernung zur Mu-Insertionsstelle der Mutanten (markiert mit $\downarrow^{\text{Mu}}$) läßt sich leicht abmessen.

Zur endgültigen Lokalisierung des Mu-Insertionsortes in RP4-2 waren noch folgende Zusatzinformationen wichtig :

Rep1 gehört zur RepS1-Gruppe, d.h. Mu ist in Sma-Fragment 1 inseriert (vgl. Abb.26.1.B). Nimmt man die kürzere Entfernung zwischen ISR1 und Mu als Richtungsvektor, so liegt die Mu-Insertion links von Tn1. In Rep3 konnte die Mu-Insertion auch links von ISR1 lokalisiert werden und zwar aufgrund von EcoRI-PstI-Doppelverdauungen der Plasmid-DNA. Auf diese Restriktionsanalysen soll jedoch nicht näher eingegangen werden, da sie nicht mehr Information lieferten als diese.

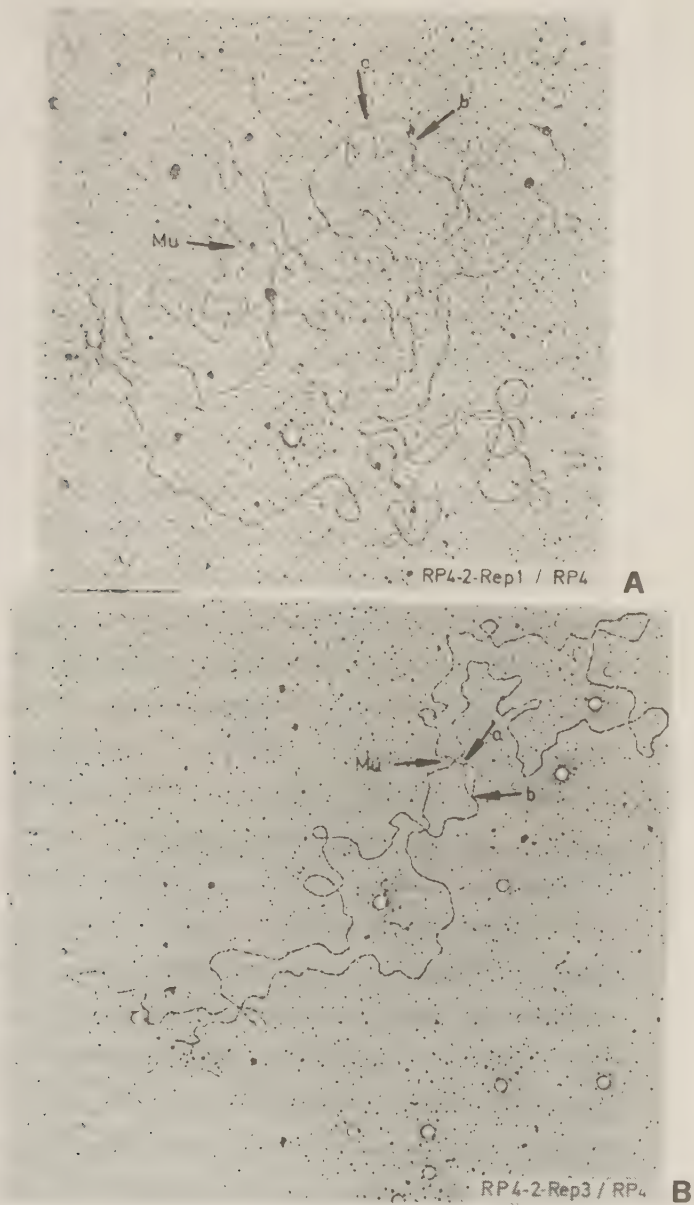


Abb. 27 : Heteroduplexkartierung von Rep1 und Rep3

Die RP4-2-Rep1:Mu Hybridplasmide wurden mit RP4-DNA hybridisiert.

Die ISR1-Insertions-Deletions-Struktur ist mit ^a↓ ^b↓, die Mu-Insertionsstelle mit ^{Mu}↓ markiert.

Ähnliche elektronenmikroskopische Bilder wurden auch bei Hybridisierungen von Rep4 und Rep5 mit RP4 gefunden.

Abb.28 enthält die Ergebnisse der bisher durchgeführten Heteroduplex-Kartierungen.

Im unteren Teil ist ein Übersichtsbild der RP4-Karte mit den Koordinaten 0 kb und 57,4 Kb (46) für die EcoRI-Restriktionsstelle gezeigt. Darin wurde der RP4-Anteil eingezeichnet, den pSR100 besitzt.

Im oberen Teil ist die RP4-2-spezifische Region vergrößert dargestellt, die für die folgende zusammenfassende Beschreibung der Ergebnisse wichtig ist. Tn1 beginnt bei 4,74 kb rechts von EcoRI. Die Länge von Tn1 beträgt 4,8 kb (47), der Endpunkt wurde demnach bei 9,54 kb eingezeichnet.

Die ISR1-Insertions-Deletions-Struktur in RP4-2 wurde nach eigenen Messungen (Startpunkt bei 5,55 kb) sowie der Zusatzinformation, daß ISR1 1,15 kb lang ist (41), in der Karte eingetragen. Die Deletion umfaßt den größten Teil des Ap-Resistenzgens bla (35).

Die Mu-Insertionen der Mutanten Rep1 und Rep5 liegen 6,36 kb bzw. 6,08 kb links von der Ap-Deletion und damit auch links von der EcoRI-Schnittstelle bei den Koordinaten 56,59 kb bzw. 56,87 kb. Die Lokalisierung "links von Eco" konnte auch durch die oben erwähnten EcoRI-PstI-Doppelverdauungen bestätigt werden.

Für die Mu-Integrationsstelle der RP4-2-Rep-Mutante Rep3 ergab sich das erstaunliche Ergebnis, daß sie innerhalb des Transposons Tn1 liegt. Die Angabe der Koordinate 5,3 kb für Rep3 ist ein Mittelwert, der aus vier verschiedenen Messungen resultiert. Die Standard-

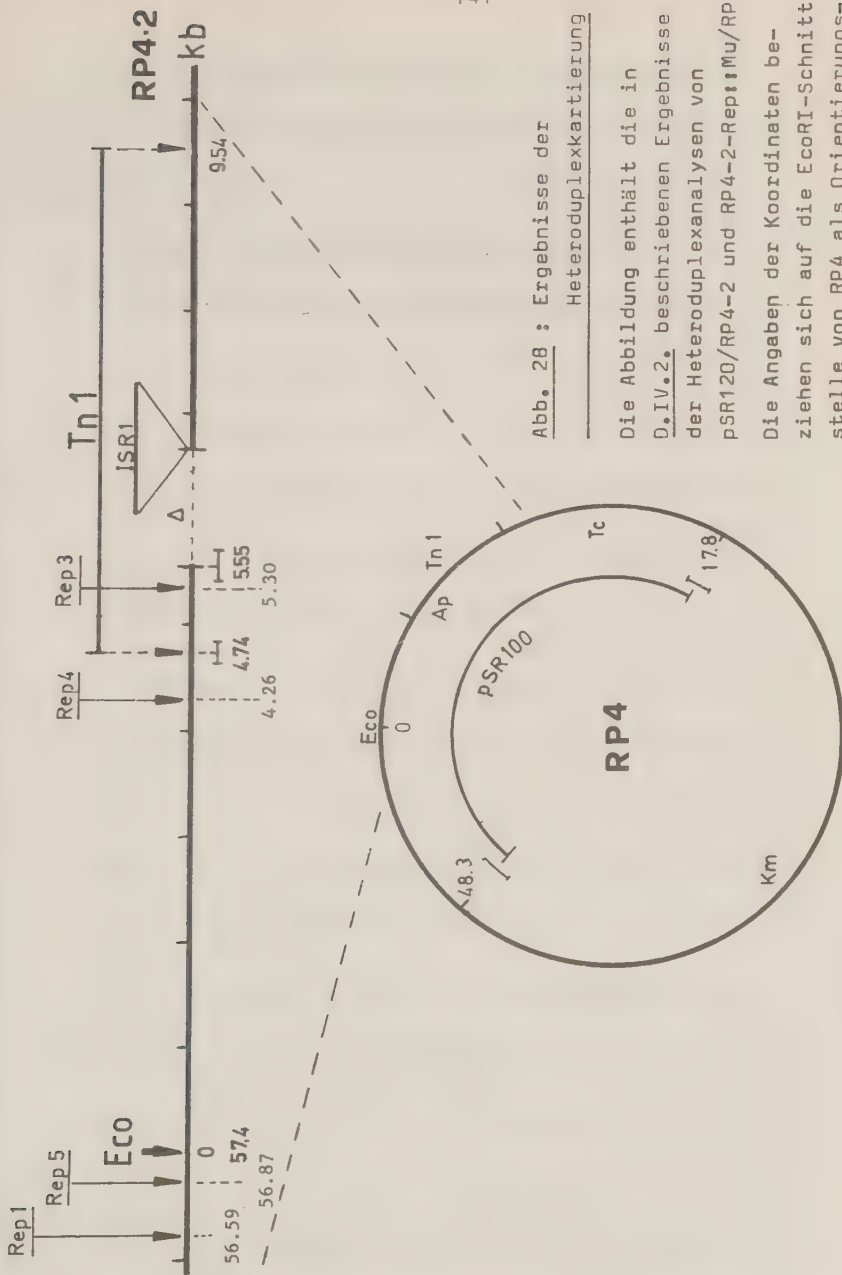


Abb. 28 : Ergebnisse der
Heteroduplexkartierung

Die Abbildung enthält die in
D.IV.2. beschriebenen Ergebnisse
der Heteroduplexanalysen von
pSR120/RP4-2 und RP4-2-Rep;Mu/RP4.

Die Angaben der Koordinaten be-
ziehen sich auf die EcoRI-Schnitt-
stelle von RP4 als Orientierungs-
punkt (Eco : 0/57,4 kb).

abweichung betrug hierbei nur 24 Basenpaare.

Diese hohe Genauigkeit konnte deswegen erreicht werden, weil die Mu-Insertion in Rep3 sehr nahe der Insertions-Deletions-Blase liegt, wie man in Abb.27 erkennen kann.

In Rep4 wurde die zur Mutation führende Mu-DNA-Insertion knapp außerhalb von Tn1 bei der Koordinate 4,26 kb gefunden.

E DISKUSSION

I. Plasmidincompatibilität

I.1. Vorbemerkungen

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Replikationssystem des Plasmids RP4 zu studieren.

Folgende Strategie lag dem Vorhaben zugrunde:

Durch Mu-Insertion sollten RP4-Replikationsgene oder andere Regionen, die für essentielle Proteine codieren, mutiert und damit einer elektronenoptischen Kartierung durch Heteroduplexanalysen zugänglich gemacht werden. Die in lebenswichtigen Genen mutierten RP4-Plasmide sollten durch Transcomplementation mit einem anderen RP4-Derivat stabilisiert werden.

In der Einleitung wurden die neuesten Kartierungsdaten von RK2-Replikationsgenen vorgestellt (19; 20; 21). Diese Ergebnisse wurden durch Klonieren von möglichst kleinen DNA-Fragmenten gewonnen. Soweit Transcomplementationsanalysen als Untersuchungsmethoden verwandt wurden, waren die zu testenden Plasmide kompatibel; die betreffenden DNA-Segmente lagen auf RP4-fremden Plasmiden kloniert vor (20).

In der vorliegenden Arbeit wurde auf Klonierung verzichtet; es wurden keine anderen als RP4-Replikons verwandt. Damit rückte jedoch zunächst das Problem der Incompatibilität der zu untersuchenden Plasmide in den Vordergrund.

Incompatibilitätsanalysen zwischen RP4-Derivaten wurden in Kap. D.I. ausführlich beschrieben. Im folgenden soll versucht werden, Modellvorstellungen zu den Wechselwirkungen zwischen RP4-Replikons zu entwickeln und diese im Zusammenhang zu dem zu diskutieren, was aus der Literatur zum Thema Incompatibilität bekannt ist.

I.2. LiteraturÜbersicht

I.2.1. Theoretische Überlegungen zur Incompatibilität

Die Tatsache, daß sich bestimmte Plasmidpaare nicht ohne entsprechenden Selektionsdruck in einer Zelle vermehren lassen, wird seit langem zur Aufklärung von Plasmidverwandtschaftsverhältnissen ausgenutzt (48; 49). Man bezeichnet diese Plasmideigenschaft der gegenseitigen Eliminierung als Incompatibilität (50).

Es muß also mindestens eine Plasmid-Gruppen-spezifische genetische Determinante geben, die ein spezieller Incompatibilitätsmechanismus erkennt.

Drei allgemeine Modelle für die Wirkungsweise von Incompatibilitätsreaktionen stehen zur Verfügung.

(A) Replikon-Modell (51)

Dieses Modell sagt aus, daß die regulierte Replikation von Plasmiden an spezifischen Membrananheftungsstellen stattfindet, deren Aufgabe es gleichzeitig ist, die replizierten Moleküle geordnet auf die Tochterzellen zu verteilen. Regulierte Replikation bedeutet hier, daß die Kopienzahl durch einen positiven Kontrollmechanismus (Initiator) konstant gehalten wird.

Incompatibilität ist in diesem Modell die Manifestation der Konkurrenz zweier Plasmide um die gleiche Anheftungsstelle, d.h. die Wechselwirkung eines Plasmides mit Replikation und Verteilung eines anderen.

(B) Inhibitor-Modell (52)

Dieses Modell wurde u.a. aus der Beobachtung entwickelt, daß in einem Hfr-Stamm (im Chromosom integriertes F-Plasmid) kein autonomes F-Plasmid etabliert werden kann (53; 54). Es wird ein Incompatibilitätsgruppenspezifischer Repressor gefordert, dessen physiologische

Aufgabe es ist, die Plasmidkopienzahl konstant zu halten. Wenn die Gesamtkopienzahl zweier inkompatibler Plasmide gleich der Kopienzahl eines Plasmides allein ist, besteht bei der Zellteilung die Möglichkeit der zahlenmäßig ungleichen Verteilung der Plasmidmoleküle auf die Tochterzellen. Das Ungleichgewicht verstärkt sich mit jeder Zellteilung.

Berechnungen auf der Basis dieses Modells (konstante Kopienzahl und zufällige Verteilung der Plasmidmoleküle bei der Zellteilung) ergaben, daß aus einer Zelle mit zwei inkompatiblen Plasmiden innerhalb weniger Generationen Segreganten mit nur einem Plasmid entstehen können (55).

(C) Verteilungsmodell (56; 57)

Nach diesem Modell existiert ein Membranprotein, das eine spezifische Plasmidsequenz erkennt, diese bindet und dann für eine geordnete Verteilung von Plasmidkopien auf die Tochterzellen sorgt. Inkompatibilität zwischen Plasmiden kommt dadurch zustande, daß für den Verteilungsmechanismus individuelle Plasmide nicht als solche zu erkennen sind, wenn sie nur die gleiche Bindungsstelle besitzen. Damit kann es zu ungleichen Zahlenverhältnissen der verschiedenen Plasmidkopien in den Tochterzellen kommen. Im Gegensatz zum Replikonmodell (51) ist hier die Membranbindungsstelle nicht an der Replikation beteiligt.

In allen drei Modellen beruht Inkompatibilität auf der Wechselwirkung zwischen essentiellen Plasmidfunktionen. Man kann grundsätzlich zwei Voraussetzungen für die stabile Vermehrung von Plasmiden annehmen :

- a) Konstante Replikationsrate bezüglich der Zellteilungsrates (d.h. Kontrolle der Kopienzahl);
- b) gesicherte Verteilung der Plasmidkopien auf die Tochterzellen.

Daraus ergeben sich auf molekularer Ebene theoretisch mindestens drei Möglichkeiten für Plasmid-spezifische genetische Faktoren, die Inkompatibilität bewirken können :

- a) spezifische Erkennungsstellen für Replikation;
- b) Kontrollfunktionen für konstante Kopienzahl;
- c) spezifische Erkennungsstellen für geordnete Plasmidkopienverteilung.

Im Replikonmodell (A) werden alle drei Mechanismen gemeinsam zur Erklärung von Inkompatibilität verwendet.

Das Inhibitormodell (B) geht nur von einer negativ regulierten Plasmidkopienzahl aus, um Plasmidverdrängungsreaktionen zu erklären. Das Verteilungsmodell (C) setzt eine konstante Kopienzahl voraus und fordert zusätzlich spezifische Membranstellen für Plasmidkopienverteilung.

I.2.2. Experimentelle Aspekte von Plasmidincompatibilitätsanalysen

Für den experimentellen Nachweis einer negativen Kontrolle (d.h. die Existenz eines Plasmid-codierten Repressors) der Plasmid-Replikation gibt es mehrere Beispiele (54; 58; 59; 60; 61). Im Hinblick auf eine umfassende Erklärung des Inkompatibilitätsmechanismus einer speziellen Plasmidgruppe stellen diese Versuche aber nur Teilaspekte dar. Die Experimente mit dem F-Plasmid wurden so durchgeführt, daß einer der Partner im Chromosom integriert vorlag, also passiv repliziert wurde, während nur das autonom replizierende F-Plasmid der nachweisbaren

Wirkung des Repressors ausgesetzt war (54; 59). Verteilungsphänomene konnten in diesem nicht-reziproken System nicht studiert werden. Ähnliches gilt für Studien an Hybridreplikons (z.B. ColE1-pSC101), in denen nur ein Teil aktiv die Replikation steuert (58).

Mittlerweile konnten durch Klonierung einzelner DNA-Fragmente des F-Plasmids tatsächlich zwei unabhängige Inkompatibilitätsdeterminanten nachgewiesen werden, wovon die eine die oben erwähnte Kopienzahl-Kontrolle bewirkt, während die andere möglicherweise eine Bindungsstelle für den Verteilungsmechanismus darstellt (62; 63). Analoge Beobachtungen wurden mit dem IncF_{II} Plasmid R6-5 gemacht (64; 65).

Die Identifizierung eines Plasmid-codierten Membranproteins für Replikation und/oder Verteilung ist jedoch bisher nicht gelungen.

Es wurde auch gezeigt, daß der Replikationsorigin selbst Inkompatibilitätsreaktionen bewirken kann (19; 66). Darüberhinaus wird in jüngster Zeit die Beteiligung von Plasmid-spezifisierten RNA-Sequenzen bei der Wechselwirkung zwischen inkompatiblen Plasmiden diskutiert (67).

Bisher ist es noch bei keiner Inkompatibilitätsgruppe gelungen, den genauen Mechanismus der Wechselwirkungen der Plasmide der jeweiligen Klassen in einem allgemein akzeptierten Modell zu beschreiben.

Zusammenfassende Darstellungen scheitern zum Teil an bisher nicht vollständig geklärten Widersprüchen, die sich nicht zuletzt aus unterschiedlichen Untersuchungsmethoden ergaben.

Ein eindrucksvolles Beispiel für derartige Schwierigkeiten sind die Experimente, die Interaktionen zwischen ColE1-Derivaten beschreiben.

Es wurde berichtet, daß E.coli Zellen in der Lage sind, zwei verschieden markierte ColE1-Replikons über viele Generationen zu vermehren (68; 58). In einer anderen Arbeit wurde gezeigt, daß sich in Rec⁺ Stämmen leicht multimere Formen aus zwei ColE1-Derivaten bilden lassen, die die Eigenschaften der Ausgangsplasmide vereint besitzen (69). Verwendet man einen Rec⁻ Stamm für Inkompatibilitätstests, sind zwei verschiedene ColE1 Plasmide selbst unter Coselektion auf die Marker beider Plasmide nicht stabil in einer Zelle vermehrbar (70). Damit ergaben sich mit den gleichen Plasmiden unterschiedliche experimentelle Ergebnisse in Rec⁻ und Rec⁺ Zellen, deren Interpretation zu verschiedenen Modellvorstellungen führte.

Im folgenden soll versucht werden, die eigenen Untersuchungen der Inkompatibilitätsreaktionen zwischen RP4-Derivaten anhand eines Modells zu diskutieren, das in wesentlichen Punkten aus dem Replikonmodell entwickelt wurde.

I.3. Plasmide und Methodik der RP4-Inkompatibilitätstests

In den Inkompatibilitätsstudien wurden verschieden mutierte RP4-Derivate verwendet. Die Mutationen in den Resistenzmarkern Ap, Km oder Tc sind extrem stabil, da sie entweder auf Deletionen oder Mu-Insertionen in den betreffenden Genen beruhen. Artefakte durch spontane Reversionen sind somit weitgehend auszuschließen.

Als "RP4-Mutanten" werden im folgenden zusammenfassend alle μ -Insertionsmutanten von RP4 und RP4-2 bezeichnet, die außer dem Defekt in Antibiotikaresistenzdeterminanten keine weiteren erkennbaren Veränderungen im Molekül aufweisen. RP4 und RP4-2 werden also, wie die Ergebnisse rechtfertigen, als gleichwertig behandelt.

Im Gegensatz zu den RP4-Mutanten besitzen die miniRP4-Derivate pSR100 und pSR120 nur noch die Hälfte der Wildtyp-RP4-Sequenzen. Damit könnten neben der Km-Resistenz und Transfereigenschaften noch weitere, bisher unbekannte genetische Determinanten verloren gegangen sein, die möglicherweise einen Einfluß auf Inkompatibilitätsreaktionen haben.

Die in der Arbeit verwandte Plasmidübertragung durch P1-Transduktion hat gegenüber anderen Verfahren mehrere Vorteile :

- a) es können auch transferdefekte Plasmide wie pSR100 als Donorplasmide verwendet werden, was sonst nur durch Transformation möglich wäre;
- b) relativ große Plasmide, wie RP4:: μ , lassen sich von P1 mit hoher Effektivität übertragen; dies würde in Transformationsversuchen große Schwierigkeiten bereiten;
- c) die Plasmid-transduzierenden P1-Lysate sind leicht zu gewinnen und über lange Zeit stabil haltbar; die Experimente lassen sich daher sehr einfach reproduzieren.

Nach Transduktion eines Donorplasmides in einen Rec^- Rezipientenstamm wurde, nach kurzer Vorinkubation, in der wahrscheinlich keine Zellteilung stattfindet, grundsätzlich auf einen Marker des Donorplasmides selektioniert.

Nach dieser Primärselektion wurde der Plasmidgehalt der Zellen von isolierten Einzelkolonien durch Titern auf geeigneten Medien quantitativ nachgetestet. Diese Methode erlaubt eine genaue Aussage über die Stärke der Inkompatibilitätsreaktionen. Sie liefert außerdem in einem weiteren Nachtest der Titerplatten Auskunft über die zahlenmäßige Zusammensetzung von Mischpopulationen in Kolonien, die in einem einfachen Stempeltest mehr oder weniger eindeutig doppelt-resistent erscheinen würden.

I.4. RP4-Verdrängungsreaktionen

In Tabelle 4 sind die Ergebnisse der Inkompatibilitäts-tests zwischen verschiedenen markierten RP4-Mutanten zusammengefaßt. Nach Primärselektion auf das Donor-Plasmid wurden Einzelkolonien auf die Anwesenheit des Rezipienten-Plasmids nachgetestet. Das ursprünglich vorhandene Plasmid wurde in allen getesteten Fällen mit hoher Frequenz eliminiert. Als Maß für die Stärke der Inkompatibilitätsreaktionen wurde der "Rezipienten-Plasmid-Verdrängungs-Faktor" eingeführt.

In den pro Ansatz untersuchten drei Einzelkolonien hatte nur noch höchstens eine von 10^7 Zellen das alte Plasmid (Verdrängungs-Faktor $\leq 10^{-7}$). Um diese Ergebnisse abzusichern, wurden weitere 50-100 Einzelkolonien jedes Versuches durch direktes Stempeln der Primärselektionsplatte auf die Antibiotikaresistenz des Rezipienten-Plasmides nachgetestet. In diesen Experimenten waren die Rezipienten-Plasmide in den Kolonien nicht mehr nachweisbar.

In Tabelle 5 ist gezeigt, daß auch pSR100 von verschiedenen RP4-Derivaten sehr stark verdrängt wird.

Aus den in den Tabellen 4 und 5 zusammengefaßten Versuchsserien kann als eindeutiges Ergebniss angegeben werden, daß sich RP4-Plasmide gegenseitig sehr stark verdrängen und daß auch der miniRP4 pSR100 diesen strengen Inkompatibilitätswirkungen ausgesetzt ist. Mit dem im nächsten Abschnitt diskutierten Modell lassen sich die beobachteten Effekte leicht erklären.

I.5. Modellvorstellungen zum RP4-Inkompatibilitätsmechanismus

Das vorgeschlagene Modell fordert in Anlehnung an die Replikon-Hypothese (51; 70) einen spezifischen Membranbindungsplatz für RP4-Moleküle, der Voraussetzung für Plasmidreplikation und geordnete Plasmidkopienverteilung bei der Zellteilung ist.

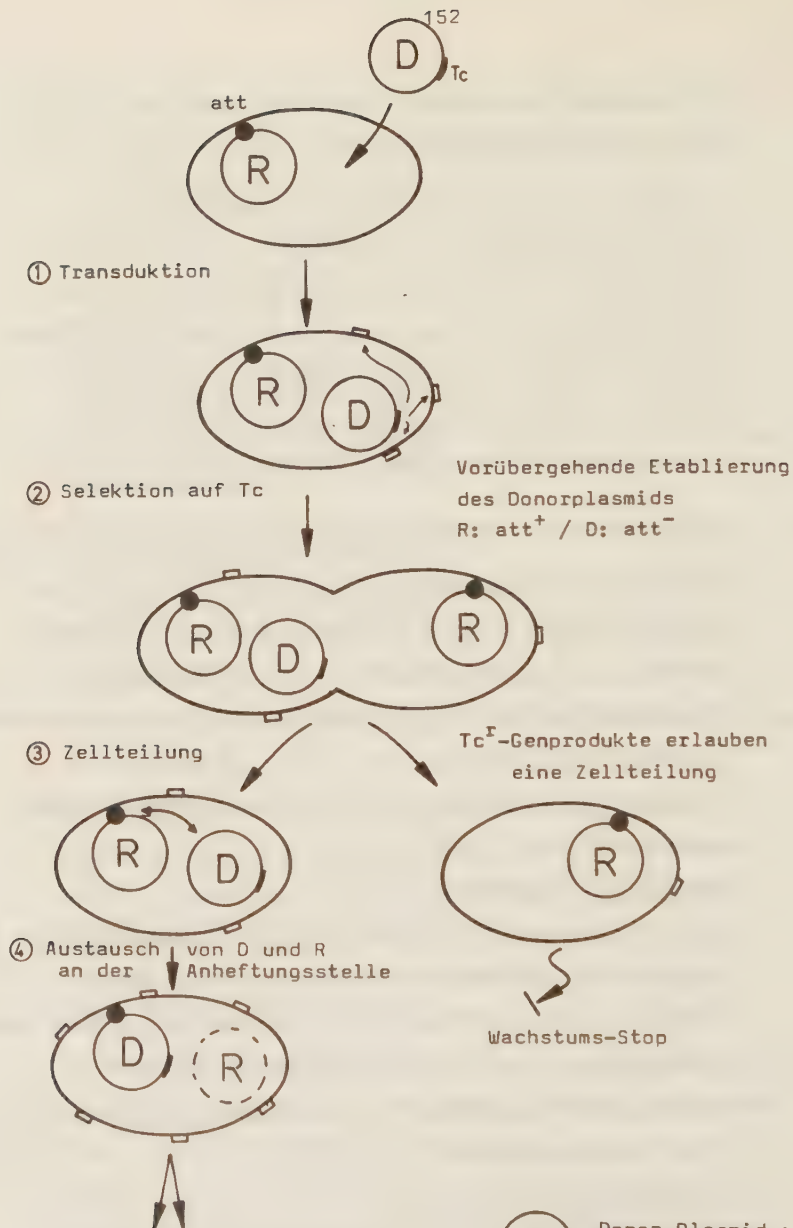
In Abb. 29 ist dieses Modell in einer Schemazeichnung dargestellt :

Abb. 29/1 : Transduktion

Ein Donor-Plasmid D (Ic^r) wird mittels Transduktion in einen Rec^- Stamm eingeführt, der das Rezipienten-Plasmid R (Km^r) besitzt. R haftet an der RP4-spezifischen Membranstelle und kann replizieren. Die übrigen 3-4 Kopien von R (vgl. Kopienzahlbestimmung Abb. 4) wurden nicht berücksichtigt.

Abb. 29/2 : Selektion

Vermutlich kann sich die eine Kopie von D auch ohne Replikation soweit stabilisieren, daß die Tetracyclin-Resistenz dieses Plasmides exprimiert werden kann.



Donor-Plasmid :

 RP4-Km::Mu (ApTc)

Rezipienten-Plasmid

 RP4-Tc::Mu (ApKm)

● att : Plasmid-Anheftungs-
stelle

▢ Tc^r - Genprodukt

Abb. 29 : Das Replikon - Modell

RP4-spezifische Inkompatibilitäts-
reaktionen werden anhand dieser
Schemazeichnung in E.I.5. diskutiert

Abb. 29/3 : Erste Zellteilung

Es ist also eine erste Zellteilung möglich, bei der allerdings nur eine Tochterzelle das noch nicht replizierte neue Plasmid D erhält. Das Wachstum der anderen Zelle wird dann stoppen, wenn die Tc^R - Genprodukte unter eine kritische Konzentration ausverdünnt worden sind.

Abb. 29/4 : Austausch von D und R an der Membranstelle

Ein echt Tc -resistenter Klon entsteht erst dann, wenn das neue Plasmid D stabil etabliert worden ist, d.h. wenn es das Rezipienten-Plasmid R von der Anheftungsstelle verdrängt hat. Jetzt wird nur D allein repliziert und geordnet verteilt, wodurch sehr schnell Rezipienten-Plasmid-freie Zellen entstehen. Daß diese Segregation schnell verläuft, beweisen die oben diskutierten Rezipienten-Plasmid-Verdrängungs-Faktoren von 10^{-7} bis 10^{-8} .

Im nächsten Abschnitt werden weitere experimentelle Ergebnisse und theoretische Überlegungen diskutiert, die Hinweise auf die Richtigkeit des vorgeschlagenen Replikonmodells liefern können.

I.6. Experimentelle Fragestellungen auf der Basis des Replikon-Modells

(a) Gibt es einen RP4-Replikations-Repressor ?

Mit der Existenz eines RP4-spezifischen Repressors, der die Kopienzahl reguliert und einem Verteilungsmechanismus, der individuelle Plasmide nicht als solche erkennt, könnten die beobachteten starken Verdrängungsreaktionen ebenfalls erklärt werden (vgl. Modell C in E.I.2.1. und Lit. 57).

Es wurde jedoch mehrfach die Beobachtung gemacht, daß RP4-Plasmide, die im Chromosom integriert vorliegen, die stabile Vermehrung von pSR100 oder pSR120 nicht be-

hindern (vgl. D.I.3.4. und D.II./III.).

Der Nachweis eines negativ wirkenden Kopienzahl-Kontrollproteins wurde im IncF_I-System gerade dadurch erbracht, daß ein integriertes F-Plasmid die Etablierung eines weiteren F-Plasmides verhindert (vgl. E.I.2.1. und Lit. 53; 54 und 59).

Daraus muß man schließen, daß die Kopienzahl von RP4 nicht von einem Replikationsrepressor reguliert wird. Es sei daran erinnert, daß das ursprüngliche Replikationsmodell (51) die positive Regulation der Replikationsinitiation fordert (vgl. E.I.2.1 A).

Die (negativ wirkende) Autoregulation eines Initiatorproteins darf jedoch nicht ausgeschlossen werden (21).

(b) Gibt es mehr als eine Membranbindungsstellen für RP4-Replikons ?

Wenn man zwei Membran-Anheftungsstellen für Replikation und/oder Kopienverteilung fordern würde, müßte es möglich sein, zwei RP4-Plasmide, die sich nur in Resistenzmarkern unterschieden, gleichzeitig in einer Zelle stabil zu vermehren, zumindest unter Selektionsdruck auf die Resistenzen beider Derivate.

Coselektion auf zwei RP4-Mutanten (z.B. RP4-Tc^r; μ und RP4-Km^r; μ auf KmTc-Medium) ist jedoch in Rec⁻ Stämmen nicht möglich. In entsprechenden Versuchen erschienen erst nach mehreren Tagen meist extrem kleine Kolonien auf den Coselektionsplatten, die sich zudem bezüglich der Marker der Plasmide als außerordentlich instabil erwiesen.

Es scheint also nur eine Membranbindungsstelle für RP4-Plasmide in einer Zelle zu geben.

(c) Wird die Membranbindungsstelle nur für Plasmid-kopien-Verteilung oder auch für Replikation benötigt, und wie fest ist die Bindung der Plasmide an dieser Stelle ?

Die Stabilität von Plasmiden mit niedriger Kopienzahl kann nur durch einen geordneten Verteilungsmechanismus erklärt werden (57). Eine spezifische Plasmid-Membran-Wechselwirkung bei der Zellteilung muß also vorausgesetzt werden. Ein Verteilungsmechanismus allein würde, wie oben erläutert, auch zu Inkompatibilitätsphänomenen führen, könnte aber nicht erklären, warum Coselektion auf zwei Plasmid-Mutanten nicht möglich ist.

Ein weiterer Hinweis darauf, daß auch die Replikation selbst an der Membranbindungsstelle stattfindet, und daß die Bindung der Plasmide an dieser Stelle sehr dauerhaft ist, könnte aus folgenden Beobachtungen abgeleitet werden. In Tabelle 1 wurden die Wechselwirkungen zwischen RP4-2 und pSR100 und pSR120 auch in Rec^+ Stämmen untersucht. Nach Transfer von RP4-2 in die Rezipienten mit den miniRP4-Derivaten und Selektion nur auf RP4-2 (Km) wurden mit hoher Frequenz Ap^r Plasmid-rekombinanten gefunden. Wenn man davon ausgeht, daß der Membranbindungsplatz normalerweise frei ist und nur für die eigentliche Replikation und Verteilung besetzt wird, ist nicht zu verstehen, warum RP4-2 die miniRP4-Plasmide nicht, wie in Rec^- Stämmen, durch einfache Konkurrenz um diese Stelle verdrängt. Nimmt man jedoch eine feste Bindung der Rezipientenplasmide an den Anheftungsstellen an und fordert weiterhin, daß nur diese

fest gebundenen Plasmide replizieren können, wird die hohe Rekombinationsfrequenz verständlich. Km^r Transconjuganten könnten in den erwähnten Beispielen nämlich sehr leicht dadurch entstehen, daß das Donor-Plasmid RP4-2 mit dem gebundenen miniRP4 an homologen Stellen fusioniert. MiniRP4:RP4-2-Hybridplasmide würden dann problemlos als Einheit replizieren und könnten durch nachfolgende Rekombinationsprozesse die beobachteten $Ap^r Km^r$ Plasmidrekombinanten bilden (Die Möglichkeit der Bildung von multimeren Plasmidformen in Rec^+ Stämmen wurde bereits in E.I.2.2. erwähnt).

Alle bisher besprochenen Phänomene, die sich aus Interaktionen zwischen RP4-Derivaten ergeben, sind mit dem Replikon-Modell vereinbar.

Im nächsten Abschnitt der Diskussion der Ergebnisse müssen jedoch gewisse Modifikationen des Modells eingeführt werden, um der Asymmetrie in den Eliminierungsreaktionen zwischen miniRP4 und RP4 Rechnung zu tragen.

I.7. Asymmetrische Incompatibilität zwischen miniRP4 und RP4

Der Hauptgrund für die Analysen von RP4-spezifischen Wechselwirkungen war der, daß untersucht werden sollte, ob sich miniRP4 (pSR100) und RP4-2-Mutanten in einer Zelle stabilisieren lassen, um Transcomplementationsstudien durchführen zu können.

Die oben beschriebenen starken Verdrängungseffekte von RP4 gegenüber pSR100 sprachen zunächst gegen diese Möglichkeit der Costabilität.

In Inkompatibilitätsexperimenten mit pSR100 als Donor-Plasmid (D.I.3.5/C) konnten jedoch mit hoher Frequenz Zellen identifiziert werden, die unter Selektionsdruck nur auf pSR100 auch das ursprüngliche Rezipienten-Plasmid (RP4-2-Tc^r:Mu) mitvermehrten (vgl. Tab.7 und 8). Offenbar ist pSR100 nicht in der Lage, eine RP4-Mutante wirksam zu verdrängen.

Wie läßt sich diese Beobachtung mit dem Replikon-Modell vereinbaren ?

In dem Modellschema der Abb. 29 wurde angenommen, daß die Bindung eines RP4-Plasmides an dem einzigen verfügbaren und für Replikation und Verteilung essentiellen Membranplatz zwar beständig und relativ fest ist, daß dort aber auch mit gewisser Wahrscheinlichkeit Austausch zweier Plasmide stattfinden kann.

Die Ergebnisse mit pSR100 als Donor-Plasmid müßten dann so diskutiert werden, daß sich RP4 von miniRP4 nur sehr selten vom Membranplatz verdrängen läßt, d.h. daß das Austauschgleichgewicht stark zugunsten von RP4 verschoben ist.

Wo und wie repliziert dann aber pSR100 in den Zellen, die unter Tc-Selektionsdruck (pSR100) wachsen und das ursprüngliche Plasmid nicht verloren haben ?

Makroskopische und mikroskopische Analysen der Kolonien, in denen viele Zellen pSR100 und RP4 enthalten, brachten hierzu folgende Hinweise (vgl. Abb. 6).

Die Kolonien wuchsen deutlich langsamer als solche, die Zellen mit nur einem Plasmid enthielten. Die Morphologie der Bakterien in den Mikrokolonien deutete auf Störungen im Zellteilungsmechanismus hin : die meisten Zellen

besaßen ein deutlich größeres Volumen als normale E.coli Zellen und es konnten sehr viele Zellfilamente gefunden werden. Phänomenologisch gesehen scheint sich pSR100 in RP4-haltigen Zellen also nur dann replizieren zu können, wenn diese wesentlich größer sind als normale E.coli Bakterien.

Der molekulare Mechanismus, der diesem Phänomen zugrunde liegt, konnte bisher nicht geklärt werden. Einige theoretische Überlegungen zu diesem Problem sollten jedoch noch angefügt werden.

Es wurde in erster Näherung angenommen, daß RP4 eine stärkere Affinität zum Membranbindungsplatz besitzt als pSR100. Ungleich stark wirkende Verdrängungsreaktionen könnten so erklärt werden.

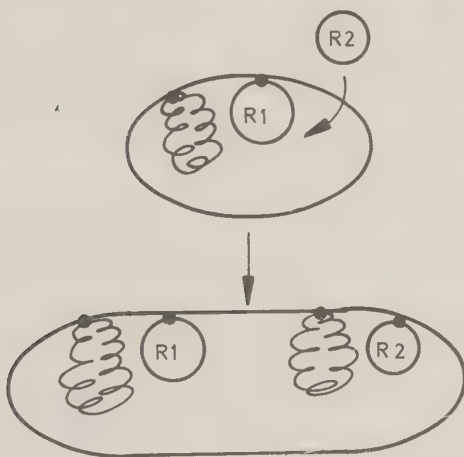
Asymmetrische Inkompatibilität wurde auch bei anderen P-Typ Plasmiden beschrieben (71; 72). Bemerkenswert ist, daß auch in diesen Arbeiten dann kleinere Kolonien gefunden wurden, wenn zwei P-Typ Plasmide gleichzeitig in einer Zelle vermehrt wurden.

Als Alternative für eine veränderte Bindungsaffinität zur Anheftungstelle könnte auch die Annahme von mehr als einer Erkennungssequenz auf RP4 dienen.

Damit könnte die Wahrscheinlichkeit, am Membranplatz zu binden, für RP4 höher sein als für miniRP4, der vielleicht aufgrund seiner Deletion eine hypothetische zweite Erkennungsstelle verloren hat.

(Auch in-vitro verkürzte RK2-Derivate zeigen abgeschwächte Inkompatibilität gegenüber Wildtyp RK2-Plasmiden, 19).

Da das Gleichgewicht der Austauschreaktionen am normalerweise nur einmal pro Zelle vorhandenen Membranplatz aus irgendeinem Grund stark zu Gunsten von RP4 verschoben ist, muß pSR100 auf eine andere Weise replizieren. Nachdem Doppelreplikation zweier RP4-Replikons aber offenbar nur in den Zellfilamenten stattfinden kann, liegt die Vermutung nahe, daß in den vergrößerten Zellen die Existenz von mehreren RP4-spezifischen Membranbindungsstellen möglich ist, wie die folgende Skizze darstellt :



Die hier angedeutete Annahme, daß die Filamente auch mehrere Chromosomen besitzen, wurde bisher nicht nachgeprüft. Mit geeigneten Färbemethoden sollte dieser Test jedoch möglich sein (73).

Es ist weiterhin nicht klar, ob Zellfilamente von Anfang an, spontan entstanden, in einer Population von Rec^- Zellen in genügender Anzahl vorhanden sind, um die

Etablierung von pSR100 in einem RP4-tragende Stamm zu ermöglichen. Beim Vergleich der Transduktionsfrequenzen erscheint dies zumindest zweifelhaft, denn ein P1(pSR100)-Lysat bildet mit Plasmid-freien Rezipienten zwar normal große, aber nicht sehr viel mehr Transduktanten als mit einem RP4-haltigen Stamm.

Somit stellt sich die spekulative Frage, ob nicht RP4 selbst einen Einfluß auf das Zellwachstum, die Zellteilung oder die Chromosomenreplikation seines Wirtstammes nimmt und ob durch das Vorhandensein von zwei RP4-Replikons, von denen der eine (pSR100) den anderen (RP4) nur sehr schlecht verdrängen kann, solche Wechselwirkungen in der Weise gestört sind, daß die beobachtete Filamentbildung auftritt.

In diesem Zusammenhang sollte noch eine Arbeit erwähnt werden, in der eine ähnliche Zellmorphologie beschrieben wird (74) : Ein E.coli Stamm, der ein F'-Plasmid vermehrt, das den chromosomalen Replikationsorigin trägt, wächst in Filamenten. Man nimmt an, daß hier das Chromosom und das F'ori_c Plasmid um einen Aktivator für die Replikationsinitiation konkurrieren müssen.

Das filamentöse Wachstum von Zellen mit pSR100 und RP4 ist mit Sicherheit nicht auf eine chromosomale Mutation des Wirtstammes zurückzuführen. Der Zustand der Doppelreplikation ist nämlich nicht stabil, was sich mit zwei Beobachtungen demonstrieren läßt. Entfernt man den Selektionsdruck auf pSR100, wird dieser sehr schnell verdrängt und es entstehen normal wachsende Kolonien, die nur das RP4-Plasmid replizieren. In seltenen Fällen,

kann es bei der Teilung der Zellfilamente zur Segregation von Zellen kommen, die nur noch pSR100 besitzen; auch diese Zellen wachsen normal schnell.

Die Prozentzahlen der Mischpopulationen in den Mikrokolonien, die in den Tabellen 7 und 8 zusammengefaßt sind, reflektieren sicher nicht die Häufigkeit dieser Segregation von reinen pSR100-Zellen. Einmal entstanden, werden die Segreganten die Zellen, in denen noch Doppelreplikation stattfindet, sehr schnell überwachsen.

Die Wechselwirkungen zwischen RP4 und pSR120 waren für den Hauptteil der vorliegenden Arbeit von geringerer Bedeutung, nachdem es sich herausgestellt hatte, daß pSR120 wegen seiner Mobilisierbarkeit nicht als der erste Transcomplementationspartner nach der Konstruktion Replikations-defekter RP4-Mutanten geeignet ist.

Im Zusammenhang mit der Diskussion von Inkompatibilitätsbeziehungen sollen die Ergebnisse aus Kap. D.I.3.4. jedoch noch einmal aufgegriffen werden.

pSR120 ist, wie die Abb.2 zeigte, ein Hybridplasmid aus pSR100 und ColE1. Die Kopienzahl dieses Plasmides ist etwa 2-3 fach höher als die von pSR100 oder RP4 (Abb.4). Die einfache Vermutung, daß dadurch der Nachteil ausgeglichen werden könnte, den miniRP4 gegenüber RP4 aufweist und daß so wieder symmetrische Eliminierungsreaktionen auftreten würden, konnte nicht bestätigt werden.

Zwar kann pSR120 besser als pSR100 RP4-Plasmide verdrängen. Dies wurde aber nur in einer von vier getesteten Einzelkolonien gefunden (vgl. Tab. 6) und die Verdrängung ist zudem wesentlich schlechter als mit RP4-Donor-Plasmiden.

Daneben traten noch weitere Phänomene auf, die sich nicht mit dem Replikon-Modell erklären lassen.

So konnten folgende Fragen, die sich aus den in D.I.2.1. und D.I.3.4. beschriebenen Experimenten ergaben, bisher nicht beantwortet werden :

- Warum verhindert oder behindert pSR120 die Aufnahme von RP4 in Rezipientenzellen ?
- Warum kommt es statt zur Verdrängung von RP4 durch pSR120 zu seltenen Ereignissen wie Rekombination sogar im Rec⁻ Stamm oder zur Integration von RP4 ins Chromosom ?
- Warum stören sich RP4 und pSR120 überhaupt, wenn dieser doch die Möglichkeit hätte, über den ColE1-Anteil zu replizieren und theoretisch nicht auf einen RP4-spezifischen Membranplatz angewiesen wäre ?

Es muß hierzu angemerkt werden, daß es auch innerhalb des Hybridreplikons RP4-ColE1 bisher unverstandene Replikationsprobleme gibt (75; 76), die sich vielleicht auch auf das Verhalten gegenüber anderen RP4-Plasmiden in der Zelle auswirken könnten.

Daß die erhöhte Kopienzahl von pSR120 allein nicht unbedingt zur Erklärung der Phänomene ausreicht, zeigt sich daran, daß für RP4-5-4 eine ähnlich hohe Kopienzahl gemessen wurde, dieser aber die Aufnahme von RP4 kaum behindert (vgl. Tab. 12).

Die Experimente mit pSR100 und vor allem mit pSR120 zeigen, daß das auf RP4 Übertragene Replikon-Modell nicht alle Situationen erklären kann und somit nicht ohne Einschränkungen oder Zusatzforderungen angewandt werden kann.

II. Konstruktion und Identifizierung von Replikations-defekten RP4-Mutanten

II.1. Die Vorteile der Mu-Mutagenese Technik

Als Voraussetzung für die Durchführung der Mu-Mutagenese von RP4 stand ein bereits erprobtes, einfaches Verfahren zur Verfügung (31), das für das Ziel der Arbeit, Replikations-defekte RP4-Mutanten zu konstruieren, weiterentwickelt wurde.

Man kann $RP4::Mu_C$ + Hybridplasmide dadurch selektionieren, daß man nach Transfer der Plasmid-Mutanten in einen Mu_{cts} lysogenen Rezipienten die Transdominanz der hitzeresistenten Mu_C + Repressoren über die des hitzeinduzierbaren Mu_{cts} Prophagen ausnützt und das Kreuzungsgemisch bei $42^{\circ}C$ inkubiert.

Eine noch einfachere Methode zur Mutation und physikalischen Markierung von RP4-Genen wäre die Transposon-Mutagenese, z.B. mit Tn7 (Tp5m). Durch Transposon-Insertionen wurden die Resistenzdeterminanten und Transferregionen auf RP4 lokalisiert (14).

Zur Mutation von Replikationsgenen schien diese Methode jedoch nicht geeignet zu sein, da man solche Mutanten nur finden kann, wenn sehr bald nach Inaktivierung der Replikationsgene Transcomplementation ermöglicht werden kann. Beim Transposon-Mutagenese-Verfahren müßte man also fordern, daß die Transposition erst unmittelbar vor der Weiterkreuzung der Plasmide stattfinden darf. Damit wäre eine sehr geringe Ausbeute von Rep^{-} Mutanten zu erwarten. Zudem müßte eine große Anzahl von Kreuzungen durchgeführt werden, um unabhängige Transpositionsergebnisse zu finden.

Bei der Mu-Mutagenese treten diese Schwierigkeiten nicht auf. Sofort nach Mu-Insertion werden die Plasmide in den Transcomplementationsstamm transferiert, wo mögliche Replikationsdefekte kompensiert werden können. Außerdem kann man davon ausgehen, daß in einem Experiment sehr viele verschiedene Mutanten entstehen. In dem in D.II.2. vorgestellten Beispiel waren es etwa 10^4 RP4-2::Mu Hybride, die aus einer einzigen Kreuzung isoliert wurden und die alle unterschiedliche Mu-Insertionsereignisse repräsentieren.

Eine Alternative zur in-vivo Mutagenese für die Kartierung von essentiellen Genen wurde in der Einleitung bereits erwähnt. Mit in-vitro Techniken ließen sich RP4-spezifische Replikationsregionen sehr eng eingrenzen, nachdem man ein Restriktionsenzym mit vielen Schnittstellen auf der Plasmid-DNA einsetzte (19; 20; 21). Die Zuordnung der DNA-Fragmente mit den gesuchten Eigenschaften zur Wildtyp-RP4-Karte erforderte jedoch weit umfangreichere Kartierungsexperimente als die mit RP4::Mu durchführbaren einfachen Heteroduplexanalysen.

II.2. Identifizierung von Replikations-defekten RP4-Mutanten

Es war das Grundkonzept der Arbeit, Mu-induzierte, Replikations-defekte RP4-Mutanten durch Transcomplementation mit dem miniRP4 pSR100 zu stabilisieren. Das Testverfahren auf Rep-Mutanten beruhte ebenfalls auf dem Prinzip der Transcomplementierbarkeit dieser Mutanten und bestand aus weiteren Kreuzungsexperimenten mit zwei Rezipienten, von denen nur einer pSR100 besaß. Der Vergleich der Transferfrequenzen eines bestimmten

Donorstammes mit den beiden Rezipienten lieferte den Nachweis von RP4-Mutanten, die auf Transcomplementation durch pSR100 angewiesen waren. Diese Mutanten wurden vereinfacht mit Rep⁻, also Replikations-defekt, bezeichnet, obwohl diese Bezeichnung, wie noch zu diskutieren ist, nicht immer richtig war.

Die Resistenzeigenschaften der verwendeten Plasmide (pSR100: Ap^rKm^S und RP4-2::Mu: Ap^SKm^r) wurden zur Anreicherung von solchen Zellen benutzt, die vermutlich beide Plasmide enthielten. Die nach Mu-Infektion und Plasmidtransfer durchgeführte Coselektion auf ApKm-Medium bot jedoch keine Gewähr für stabile Anwesenheit von pSR100 in den RP4-2::Mu Transconjuganten. In Mischpopulationen genügen wenige Ap-resistente Zellen, um durch Abbau von Ampicillin das Wachstum einer überwiegend aus Ap-sensitiven Zellen bestehenden Kolonie zu erlauben.

Nach Einzelkoloniereinigung von Kolonien der ApKm-Coselektion auf Km und Nachtest auf Ap waren jedoch relativ stabil doppelt-resistente Zellen identifizierbar. Unter diesen wurden dann mit guter Ausbeute (20%) solche gefunden, die Replikations-defekte RP4-2 Mutanten zusammen mit pSR100 besaßen. Dadurch wurde die Theorie bestätigt, daß unter Selektionsdruck auf das Rep⁻ Plasmid (Km) der Transcomplementationspartner pSR100 trotz Inkompatibilität beider Plasmide mitvermehrt wurde.

Aus den Inkompatibilitätsanalysen zwischen RP4 und pSR100 war bekannt, daß Zellen mit beiden Plasmiden Mikrokolonien bildeten.

Auch diese Tatsache wurde bei der Suche nach Rep⁻Mutanten

ausgenutzt. Auf den erwähnten Coselektionsplatten waren mit etwa 10% Häufigkeit sehr kleine Kolonien zu erkennen. Es stellte sich im weiteren heraus, daß nur solche Mikrokolonien die gesuchten Transcomplementationssysteme pSR100/RP4-2::Mu enthielten.

Man kann daraus schließen, daß Rep⁻ Mutanten noch Inc⁺ sind, wenn man davon ausgeht, daß die Bildung von Mikrokolonien mit einer Incompatibilitätsfunktion des RP4-Plasmids in Zusammenhang steht.

Der gezielte Nachtest von Mikrokolonien der Primärselektion verlief in mehreren Schritten (vgl. Abb. 14 und 15):

- 1) Anzucht der ausgewählten Mikrokolonien auf Km-Medium
- 2) Nachtest auf Stabilität von Ap^r
- 3) Stempelkreuzung mit den beiden Testrezipienten
- 4) Plasmidanalyse im Agarosegel

In der Kreuzung fiel die große Zahl von Kolonien auf (16 von 20), die ihr RP4-2::Mu Plasmid nicht weitertransferieren konnten, obwohl sie es aufgrund der stabilen Resistenzen haben sollten; im Agarosegel war in diesen Stämmen nur noch pSR100 zu erkennen.

RP4-2::Mu war in den betreffenden Zellen im Chromosom integriert worden, eine Möglichkeit, die durch ausführliche Stabilitätsuntersuchungen später bestätigt wurde. Die Nachreinigung solcher Kolonien ergab, daß die Zellen wieder normal schnell wuchsen und die ursprüngliche Eigenschaft der Bildung von Mikrokolonien verloren gegangen war. Dieser erste Hinweis auf mögliche Instabilität wurde in weiteren Stammreinigungen und Nachtests von Stämmen mit Rep-Mutanten beachtet, indem jeweils nur sehr kleine Kolonien weiterverarbeitet wurden.

Die in D.II. beschriebenen Stempeltests und Plasmidanalysen brachten indirekt noch zwei weitere Ergebnisse, auf die bisher noch nicht eingegangen wurde :

a) Nach Mu-Insertion wurde kein Inc⁻Rep⁺ RP4-Mutante gefunden, also ein Plasmid, das pSR100 zwar nicht verdrängt, aber auch nicht auf dessen Genprodukte angewiesen ist. In Kreuzungstests wären solche Mutanten sehr leicht nachweisbar gewesen.

Das könnte bedeuten, daß es mehrere Inkompatibilitätsfunktionen gibt, die nicht mit der Ein-Schritt-Mutagenese durch Mu ausschaltbar sind, oder daß eine mutierte Inkompatibilitätsregion nicht komplementierbar letal für das Plasmid oder die Zelle ist.

Es gibt in der Literatur Hinweise über ähnliche Schwierigkeiten, Inkompatibilitätsfunktionen zu mutieren.

So zeigten Experimente an einem aus zwei verschiedenen Replikons bestehenden Hybridplasmid, daß es nicht möglich ist, Inc⁻Rep⁺ Derivate zu erhalten, sondern daß alle Inc⁻ Mutanten durch eine zweite Mutation gleichzeitig Rep⁻ geworden waren (77).

b) In allen Nachtest wurde nach Mutanten gesucht, die man als Etablierungs-defekt bezeichnen könnte. Das wären RP4-2::Mu Plasmide, die zwar zur ersten Etablierung in einem Rezipienten ein Genprodukt von pSR100 benötigen, dann aber alleine weiter replizieren und pSR100 wie üblich verdrängen würden. Nachdem solche Mutanten in mehreren hundert getesteten Kolonien nie gefunden wurden, ist die Existenz eines "Etablierung-Genprodukts" sehr unwahrscheinlich.

III. Genetische Charakterisierung Transcomplementations-abhängiger RP4-Mutanten

III.1. Vorbemerkungen

Bei den Versuchen zur Konstruktion von RP4-Rep^- bzw. den Nachtests auf solche Plasmide wurde nachgewiesen, daß nur in Mikrokolonien das Transcomplementationssystem $\text{RP4-2-Rep}::\text{Mu/pSR100}$ zu finden war. Erste Hinweise darauf, daß dieses System nicht immer stabil funktioniert, kamen aus der Beobachtung, daß aus Mikrokolonien wieder normale Kolonieformen segregieren können.

In den in D.III.2. beschriebenen ausführlichen Stabilitätsanalysen wurde für dieses Phänomen der Begriff "Reversion" benützt, womit angedeutet werden sollte, daß der Rep^- Phänotyp der RP4-Mutanten irgendwie verloren gehen kann.

Die Einteilung der "Rep-Revertanten" in 5 Klassen (A bis E) erfolgte aufgrund genetischer Befunde (vgl. Tab.10). Bei den quantitativen Stabilitätsexperimenten mit einer Auswahl von Rep-Mutanten wurden die einzelnen Plasmidvarianten in wechselnden Zahlenverhältnissen gefunden (vgl. Tab.11).

Die genetischen Analysen wurden durch Längenbestimmungen der Plasmide im Agarosegel ergänzt (vgl. Abb. 19). Wenn RP4-Mutanten von Rep^- zu Rep^+ revertieren können, war zu erwarten, daß solche Revertanten auch in Kreuzungsexperimenten gefunden werden können, wenn der Rezipientenstamm kein transcomplementierendes Plasmid

enthält. Transconjuganten aus solchen Kreuzungen wurden in D.III. beschrieben und sollen im nächsten Abschnitt zusammen mit den Stabilitätsbestimmungen der ursprünglichen RP4-2-Rep⁺Mu Stämme diskutiert werden.

III.2. Möglichkeiten der Überwindung des Rep⁻ Phänotyps

Mit der Einteilung dieses Kapitels in fünf Unterpunkte soll versucht werden, genetische Befunde und Plasmidlängenanalysen bei der Diskussion verschiedener Arten der Reversion gleichermaßen zu berücksichtigen.

III.2.1. Integration von RP4-2::Mu ins Chromosom

Mit RepX-A wurde eine Plasmidvariante bezeichnet, die sich nicht mehr weitertransferieren läßt.

Bereits bei der ersten Suche nach Rep⁻ Mutanten fielen Kolonien auf, die im Stempeltest keinen Plasmidtransfer zeigten, obwohl die Marker von RP4-2::Mu vorhanden waren.

Das Gelbild zeigte für RepX-A-Stämme nur pSR100 als autonomes Plasmid (vgl. Abb. 19). Das RP4-2::Mu Plasmid liegt im Chromosom integriert vor, was anhand der Ergebnisse in Abb. 20 bewiesen werden konnte. In dem dort untersuchten Beispiel (Rep1-A-8) fand die Integration von RP4-2::Mu in der Gegend von "arg" im E.coli Chromosom statt, wie der Gradient der Rekombinationsfrequenzen bei Kreuzung mit einem polyauxotrophen Rezipienten zeigt. Durch RP4-Integration ist also ein neuer Hfr-Stamm entstanden.

Der Mechanismus der Integration ist unbekannt, könnte aber theoretisch mit Mu-vermittelter, RecA-unabhängiger Cointegratbildung erklärt werden, wie sie aus anderen Beispielen bekannt ist (78).

Auch die Beteiligung von Funktionen des Transposons Tn1 bei der Plasmid-Integration könnte möglich sein. Es wird diskutiert, daß Fusion zweier Replikons eine Zwischenstufe beim Prozeß der Transposition ist (79).

Andere RepX-A Stämme wurden nicht so eingehend untersucht, wie das oben beschriebene Beispiel. Ein erster Überblick über eine Serie von RepX-A Derivaten ergab jedoch, daß es auch andere Startstellen der Chromosomenmobilisierung, also andere RP4-Integrationsstellen, gibt und daß einige RP4-Integrationen nicht zu nachweisbarem Gentransfer führen.

Die Beobachtung, daß integrierte RP4-Plasmide keine Inkompatibilitätsreaktionen mit pSR100 zeigen, fand bei der Diskussion des in E.I.5. vorgeschlagenen Modells Berücksichtigung.

III.2.2. Rep-Reversionen unter Verlängerung von RP4-2::Mu

Die Bezeichnung RepX-B müßte nach den Ergebnissen der Plasmidlängenanalyse aufgeteilt werden.

Genetisch zeigte sich RepX-B daran, daß ein Plasmid entstanden war, das im Gegensatz zum Ausgangsplasmid Ap^r geworden war, das immer noch die Mu_c+ Insertion besaß und sich im Kreuzungsexperiment wie ein normales RP4-2::Mu Hybridplasmid verhielt.

Dabei kann die Länge des Plasmides gleichbleiben (dieser Fall wird im übernächsten Abschnitt diskutiert) oder mehr oder weniger deutlich zunehmen (Abb.19/ 4, 5). Verlängerte Rep-Revertanten wurden auch in Kreuzungen mit dem nicht-permissiven Rezipienten S302-20 isoliert (Abb.21/1; Abb.23/2,4).

Die Rep⁻ Plasmide müssen in diesen Fällen ein Stück DNA dazugewonnen haben, das ihnen wieder die Eigenschaften Ap^r und Rep⁺ verleiht. Diese Funktionen können nur aus pSR100 stammen, und die einfachste Erklärung für die Übertragung der genetischen Information wäre die Annahme, daß eine Fusion beider Plasmide stattgefunden haben könnte. Für derartige Cointegratbildung könnte man wieder die erwähnten Transposonfunktionen von Tn1 verantwortlich machen.

Zumindest in einem Fall kann aufgrund der Plasmidlängen auf eine exakte Fusion geschlossen werden (Rep8+pSR100 in Abb.23/ 2,4). Die Plasmidlängenaddition stimmt jedoch nicht immer, und man müßte annehmen, daß auch Abbauprodukte von möglichen Cointegraten die genannten Eigenschaften besitzen.

Genauere Plasmid-DNA Analysen der beschriebenen Revertanten wären nötig, um den Mechanismus ihrer Bildung aufzuklären.

Ein längenmäßig wahrscheinlich exaktes RP4-2::Mu+pSR100 Fusionsplasmid zerfällt, wenn es in einen Rec⁺ Stamm transferiert wird, in Plasmide der Länge RP4::Mu, RP4 und pSR100.

Welche Vorgänge zu den oben postulierten unvollständigen Abbaureaktionen der Cointegrate in Rec⁻ Zellen führen, ist nicht klar.

III.2.3. Rep-Reversion unter Verkürzung von RP4-2::Mu

Rep-Revertanten mit verminderter Plasmidlänge bilden eine einheitliche Klasse. In den bisher untersuchten Fällen betrug die Verkürzung im Rahmen der Genauigkeit der Gelelektrophorese genau den Betrag, der vorher durch Mu-Integration hinzugekommen war (Abb.19/8).

Der Mu-Verlust wurde auch genetisch nachgewiesen (RepX-E in Tab.10).

Die Annahme liegt daher nahe, daß die Mu-Insertion exakt rückgängig gemacht worden war und so eine echte Reversion stattgefunden hat.

Exakte Mu-Excision wird in der Literatur als extrem seltenes Ereignis beschrieben. Zunächst muß hierzu im Mu-Genom selbst eine spezifische Mutation stattfinden (MuX), und erst diese MuX-Mutante ist dann in der Lage, in sehr seltenen Fällen fehlerfrei aus der Wirts-DNA zu desintegrieren (80).

Neben der von Mu selbst veranlassten Excision könnte man auch Rekombination annehmen, wobei ein Austausch der Genregion mit der Mu-Insertion durch die intakte Sequenz möglich wäre.

Auch dieser Prozeß kann nur mit geringer Wahrscheinlichkeit ablaufen, da die Zellen Rec^- sind.

Welcher Mechanismus der fehlerfreien Mu-Excision zugrunde liegt, kann nicht entschieden werden.

Festzuhalten ist jedoch, daß RepX-E Revertanten bei Stabilitätstests und Kreuzungen mit Plasmid-freien Rezipienten nur selten gefunden wurden.

III.2.4. Rep-Revertanten mit unveränderter RP4-2::Mu Länge

Hier muß unterschieden werden zwischen solchen Revertanten, die die in RP4-2 aufgrund der Deletion im blauen fehlende Ap-Resistenz zurückgewonnen haben (RepX-B) und solchen, die noch Ap-sensitiv sind (RepX-C).

Man könnte annehmen, daß zumindest die Ap-resistenten Revertanten-Plasmide (RepX-B) Abbauprodukte von

RP4-2::Mu+pSR100 Cointegraten sind, die wieder die ursprüngliche Länge erreicht haben, wobei die Ap-Resistenz und die entsprechende Rep-Funktion gegen eine andere RP4-Region ausgetauscht wurde. Die oben erwähnten geringfügig längeren RepX-B Revertanten könnten die Hypothese unterstützen, daß es schrittweise verkürzte Cointegratformen gibt.

Die Entstehung der Ap^S RepX-C Revertanten könnte theoretisch mit den gleichen Modellvorstellungen erklärt werden. Daß diese zumindest nicht in allen Fällen anwendbar sind, zeigt folgende Beobachtung.

Rep3-C wurde nach Plasmid-DNA Isolierung näher charakterisiert. Das Molekül ist im Heteroduplexexperiment nicht vom Ausgangsplasmid Rep3 zu unterscheiden. Damit ist gezeigt, daß die Mu-Insertion noch an der gleichen Stelle sitzt und daß auch sonst keine erkennbaren Umstrukturierungen im Molekül stattgefunden haben, die den Rep⁺ Phänotyp wieder hergestellt haben könnten.

Wie noch ausführlich zu diskutieren ist (E.IV.3.), liegt in der DNA-Region zwischen Tn1 und der EcoRI-Schnittstelle auf RP4 eine Funktion, die für die Wirtszelle aus unverständener Ursache tödlich ist, wenn deren Expression oder Wirkung nicht von einem RP4-codierten Repressor unterdrückt wird (20). In dieser Gegend kartiert auch Rep3 (D.IV.2.).

Zur Vereinfachung der weiteren Diskussion soll diese potentiell letale Funktion mit "kill" bezeichnet werden. Nimmt man an, daß in der Mutante Rep3 das Gen für den kill-Repressor durch die Mu-Insertion inaktiviert wurde, wäre die Reversion zu Rep3-C sehr einfach durch eine

zweite, spontane Mutation im kill-Gen selbst zu erklären. Damit wäre dann auch der Repressor nicht mehr nötig, und die Zellen wären nicht mehr auf pSR100-Transcomplementation angewiesen, wie in den Kreuzungen mit diesen Revertanten-Plasmiden gezeigt wurde.

III.2.5. Verlust des RP4-2-Rep; μ Plasmides

Die in E.I. diskutierten asymmetrischen Incompatibilitätsreaktionen zwischen pSR100 und RP4 konnten auch bei den Stabilitätsanalysen von Rep⁻ Mutanten beobachtet werden. Mit "Reversion D" (Tab.10) wurde die Tatsache bezeichnet, daß der Zustand der Replikation zweier Plasmide in einer Zelle in seltenen Fällen dadurch überwunden werden kann, daß RP4-2-Rep; μ von pSR100 verdrängt wird (vgl. Tab.11).

Die Prozentwerte, mit denen diese Segregationen nach 40 Generationen unselektiver Anzucht gefunden wurden, sagen sicher nichts über die Stärke der pSR100-bewirkten Verdrängungsreaktion aus, da Zellen mit einem Plasmid wesentlich schneller wachsen als solche mit zwei Replikons.

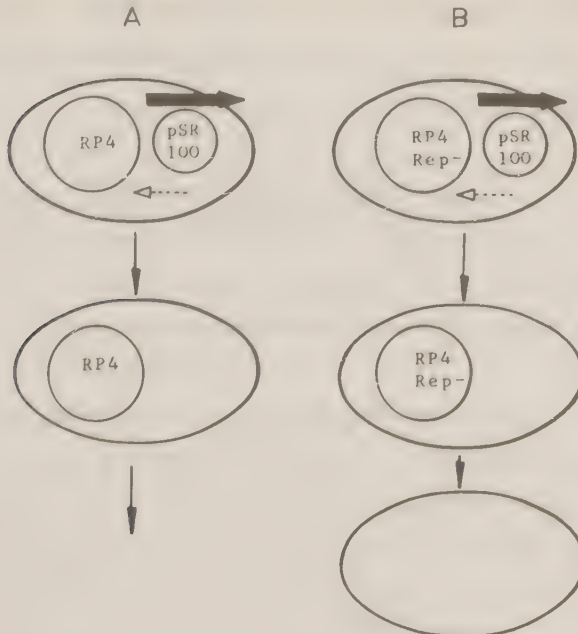
Man kann jedoch von einer sehr geringen Wahrscheinlichkeit dieses Prozesses sprechen, denn die anderen Arten der Reversion, wie RP4-Integration ins Chromosom, Cointegratbildung, Mu-Excision oder Rekombination beruhen sicher auch auf sehr selten ablaufenden genetischen Mechanismen und werden bei Stabilitätstests z.T. noch häufiger gefunden, als die Verdrängung des Rep⁻ Plasmides durch pSR100.

III.2.6. Warum entstehen keine Plasmid-freien Zellen ?

In der nachfolgenden Skizze sollen durch die Pfeile Richtung und Stärke der Eliminierungsreaktionen zwischen RP4 und pSR100 verdeutlicht werden.

Teil A) RP4 verdrängt pSR100 sehr stark, die umgekehrte Segregationsrichtung ist nur selten zu finden. Aus den zwei-Plasmid-Zellen werden ohne Selektionsdruck sehr schnell reine RP4-Zellen entstehen.

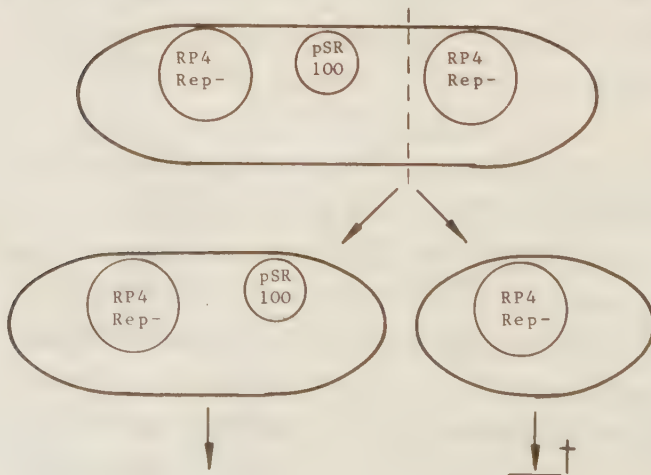
Teil B) Wenn das RP4-Rep⁻ Plasmid pSR100 verdrängt, könnte es nach Ausverdünnen der benötigten Genprodukte selbst nicht mehr replizieren und es müßten mit hoher Frequenz Plasmid-freie Zellen entstehen, wenn nicht auf das Rep-Plasmid selektioniert wird.



Wenn die Annahme richtig ist, daß das langsame Zellwachstum bei Doppelreplikation irgendwie auf Inkompatibilitätsreaktionen zwischen RP4 Derivaten zurückzuführen ist, muß man fordern, daß Rep⁻ Mutanten noch Inc⁺ sind, denn die Teilungsfähigkeit der Zellen mit diesen Mutanten ist stark beeinträchtigt (Abb. 24).

Dann ist aber nicht ohne weiteres zu verstehen, warum der in Teil B der Skizze angedeutete Prozeß nicht abläuft, d.h. warum nie Plasmid-freie Zellen gefunden werden.

Einen theoretischen Lösungsvorschlag für dieses Problem bietet die nächste Zeichnung. Dort wird angenommen, daß nach der schematisch angedeuteten Teilung eines Zellfilaments eine Zelle segregiert wird, die nur das RP4-Rep⁻ Plasmid bekommen hat. Diese Zelle ist nicht weiter lebensfähig, eine neue Zellteilung, bei der theoretisch eine Plasmid-freie Zelle segregieren müßte, kann nicht stattfinden.



III.3. Quantitative Kreuzungsexperimente

In Kapitel D,III.3. wurden die Ergebnisse von Kreuzungsversuchen zwischen allen 11 Rep-Mutanten und 6 verschiedenen Rezipientenstämmen beschrieben (Tab.12). Der Vergleich der Transferfrequenzen mit S302-20 und S302-30(pSR100) Rezipienten bestätigte die Transcomplementations-abhängige Mutation in den Testplasmiden. Die im nicht-permissiven Rezipienten S302-20 gefundenen Plasmide lassen sich aufgrund ihrer Länge in die bei den Stabilitätsanalysen diskutierten Revertanten-Klassen einordnen. Die übrigen Kreuzungsergebnisse bzw. Transconjugantenanalysen sollen in den nächsten drei Abschnitten diskutiert werden.

III.3.1. Warum sind R751 und RP4-7 nicht zu Transcomplementation der Rep-Mutationen fähig ?

Obwohl die Transferfrequenzen bei Kreuzungen von Rep-Plasmiden mit S302-80(RP4-7) in einigen Fällen relativ hoch waren (vgl. Tab.12), wurde beim Nachtest der Transconjuganten eine außerordentliche Instabilität festgestellt. Die Marker beider Plasmide ließen sich auch nicht durch entsprechende Selektionsbedingungen in einem Klon stabilisieren.

Die aufgrund der Inkompatibilitätstests zu erwartenden starken und wahrscheinlich symmetrischen Verdrängungsreaktionen verhindern also die Etablierung eines Transcomplementationssystems zwischen RP4-7 und RP4-2-Rep::Mu.

Nachdem R751 aufgrund seines Inkompatibilitäts-verhaltens der gleichen Gruppe wie RP4 zuzuordnen ist (43), war zu vermuten, daß er auch ein ähnliches Replikationssystem besitzt.

Transcomplementationsversuche zwischen RP4-Rep⁻ und R751 schlugen jedoch fehl. Das könnte wieder, wie bei RP4-7, mit starker Unverträglichkeit der Plasmide erklärt werden. Mit S302-70(R751) waren die Transferfrequenzen allerdings in vielen Fällen noch wesentlich niedriger als mit RP4-7 Rezipienten.

Vielleicht könnte diese Beobachtung als Hinweis darauf gedeutet werden, daß es zumindest graduelle Unterschiede in den Rep-Genprodukten zwischen R751 und RP4 gibt.

Es konnte gezeigt werden, daß nur ein kleines EcoRI-Fragment von R751, das mit der RP4-origin-Region Homologie aufweist, Inkompatibilitätsreaktionen auslöst (66). Es wäre nun interessant zu testen, ob andere R751-Fragmente, die keine Inkompatibilität mehr zeigen, Replikations-defekte RP4-Mutanten transcomplementieren können. Damit könnte die Frage beantwortet werden, ob die Zuordnung zur IncP-Klasse auch Homologie in spezifischen Replikationsgenprodukten beinhaltet.

III.3.2. Kreuzungen zwischen Rep-Donoren und pSR120-Rezipienten

Das Hybridplasmid miniRP4-ColE1 (pSR120) vermindert die Etablierungswahrscheinlichkeit von weiteren RP4-Plasmiden in den Rezipientenzellen sehr stark.

Dies zeigte sich bereits mit normalen RP4-Plasmiden (vgl. Tab.1) und wurde auch in Kreuzungen mit den RP4-2 Mutanten bestätigt (vgl. Tab.12).

Transconjugantenanalysen bewiesen außerdem, daß pSR120 nicht in der Lage ist, ein funktionsfähiges Trans-complementationssystem mit RP4-2-Rep::Mu zu bilden. Transconjuganten aus den Kreuzungen mit Rep1, Rep3 und Rep8 wurden näher untersucht; sie konnten in drei Gruppen eingeteilt werden.

(a) Man kann Revertanten der Rep-Mutanten finden, die dann pSR120 verdrängen.

Die Rep-Revertanten selbst entsprechen längenmäßig den verschiedenen Klassen, die bereits in den Stabilitätstests und in Kreuzungen mit S302-20 gefunden und dort diskutiert wurden.

(b) Aus der starken Unverträglichkeit der Plasmide resultierte sehr häufig auch Integration der Rep-Mutante ins Chromosom. Die Hfr-Eigenschaft dieser Stämme wurde zwar nicht untersucht, die RP4-Integration kann aber auch dadurch bewiesen werden, daß pSR120 aus solchen Stämmen mit hoher Frequenz mobilisiert wird.

Entsprechende Transferfunktionen können nur von dem integrierten RP4 kommen.

Es wurde bisher nicht getestet, ob sich dieses in E.coli sehr effektive Mobilisierungssystem auch bei anderen gram-negativen Rezipienten anwenden läßt. Das Transfer- bzw. Mobilisierungssystem selbst sollte theoretisch einen weiten Wirtsbereich ermöglichen. Fraglich ist es noch, ob sich pSR120 auch in anderen als E.coli Bakterien etablieren läßt.

(c) Neben Veränderungen an den Rep-Mutanten (Reversion oder Integration) wurden auch Modifikationen an pSR120 gefunden, die dazu führten, daß sich Rep-Mutanten in

den betreffenden Stämmen vermehren ließen.

Dabei ist nicht klar, ob die Veränderungen an pSR120 bereits vor der Kreuzung spontan oder erst in Wechselwirkung mit den Rep-Donor-Plasmiden entstanden sind.

Es wurden sowohl längere als auch kürzere pSR120-Derivate gefunden, die die Replikation eines mutierten RP4-2 Plasmides in der gleichen Zelle erlauben (vgl. Abb.21/7;8; Abb.22/6;7 und Abb.23/5).

Von Interesse waren vor allem die Plasmide pSR1234, pSR1235 und pSR1283, die gegenüber pSR120 eine starke Verkürzung aufwiesen und die im Agarosegel als Plasmide mit hoher Kopienzahl identifiziert wurden.

Vermutlich stehen diese Plasmide allein unter der Replikationskontrolle des ColE1-Anteils. Sie haben, wie Transformationsversuche zeigten, die RP4-spezifischen Resistenzdeterminanten verloren und besitzen vielleicht gerade nur noch soviel RP4-Sequenzen, wie zur Transcomplementation benötigt werden. Es wäre zu prüfen, ob mit diesen Derivaten die RP4-spezifischen Rep-Genprodukte in einem Minizell-System analysiert werden könnten.

Aus der Bandenintensität im Agarosegel könnte bei den Stämmen mit pSR1234 und pSR1235 (Abb.22/6;7) auf eine Erhöhung der Kopienzahl auch des Rep3-Moleküls geschlossen werden. Genauere Messungen z.B. durch analytische Ultrazentrifugation, stehen hierzu noch aus.

Die langen Generationszeiten von Stämmen mit Rep-Plasmid und pSR100 sind vermutlich auf störende Einflüsse der Plasmide untereinander und/oder mit dem Wirtsmetabolismus zurückzuführen.

Der Vergleich der Generationszeiten (vgl. Tab.13) der pSR120-Transconjuganten-Stämme mit denen, die ein normales pSR100-Transcomplementationssystem haben, läßt folgende Interpretationen zu.

Der Stamm S144 (Rep1+pSR1214 = verlängertes pSR120-Derivat) wächst ebenso langsam wie S131(Rep1+pSR100). Die pSR120 Verlängerung hat offenbar nur die stark negativen Wechselwirkungen zwischen pSR120 und RP4 vermindert.

Dagegen hat S143 (Rep1+pSR1213 = verkürztes pSR120-Derivat mit niedriger Kopienzahl) wieder eine normale, d.h. der Kontrolle mit nur einem Plasmid entsprechende Generationszeit.

Damit wurde gezeigt, daß sich die Funktion, die zu den Zellteilungsstörungen führt, durch Deletion aus der pSR120-DNA entfernen läßt, ohne daß die Transcomplementationsfähigkeit darunter leidet. Dieser Effekt wurde bei pSR100 nie beobachtet. Der erwähnte störende Einfluß auf die Zellen muß also von einer essentiellen RP4-Rep-Funktion ausgehen; diese läßt sich aus pSR120 entfernen, denn pSR120 hat eine zweite Replikationseinheit (ColE1). In S344 wird die Mutante Rep3 von pSR1234 (multicopy-Derivat von pSR120) transcomplementiert. Die Generationszeit dieses Stammes ist deutlich kürzer als die von S331 (Rep3+pSR100), aber doch noch etwas länger als die von Stämmen mit Rep3-Revertanten (z.B. S321). Ob dies mit der vermuteten erhöhten Kopienzahl des Rep3-Plasmides zusammenhängt, kann zur Zeit noch nicht beantwortet werden.

III.3.3. RP4-5-4 complementiert nur echte Rep⁻ Mutanten

Die Aussage in der Überschrift dieses Abschnittes ergibt sich allein aus der Tatsache, daß RP4-5-4 ein stabiles, autonom replizierendes RP4-Replikon ist. Es ist sehr unwahrscheinlich, daß für RP4-5-4 nur aufgrund seiner verminderten Molekül-Länge, eine oder mehr RP4-spezifische Replikationsfunktionen entbehrlich sind.

Damit kann die Bezeichnung "Replikations-defekt" für diejenigen RP4-2 Mutanten nicht mehr aufrecht erhalten werden, die sich von RP4-5-4 nicht complementieren lassen.

In der Einleitung wurde diese Einschränkung bereits berücksichtigt, indem definiert wurde, daß mit "Rep⁻" alle Mutanten bezeichnet werden sollten, die sich nur durch Transcomplementation mit einem anderen RP4-Derivat vermehren lassen. Ohne Rücksicht auf den Genotyp der Mutanten wurde die Umschreibung "Rep" in der vorliegenden Arbeit beibehalten, um eine Vereinfachung der Plasmid-Nomenklatur zu erreichen.

In E.III.2.4. wurde im Zusammenhang mit der Diskussion von Rep-Revertanten auf die Existenz einer sog. kill-Funktion auf RP4 hingewiesen.

Diese wurde dadurch gefunden, daß das RP4-Fragment zwischen Tn1 und EcoRI nicht ohne die Gegenwart einer RP4-codierten Repressorfunktion kloniert werden konnte (20). Das Repressorgen wurde in dieser Arbeit nicht genauer kartiert, scheint jedoch relativ weit von der kill-Region selbst zu liegen (20).

Es gibt miniRP4-Derivate, wie das in der Einleitung vorgestellte Plasmid pCT5, die ohne die kill-Genregion auskommen und stabil replizieren. Damit ist gezeigt, daß es neben essentielle Replikationsgenen auch noch eine oder mehr Funktionen auf RP4 gibt, die, falls sie mutiert sind, transcomplementiert werden müssen, um die betreffenden Mutanten vermehren zu können.

In diesem Sinne wären die genetischen Determinanten, die dem kill-Phänomen zugrunde liegen, ebenfalls als essentiell zu bezeichnen, da deren strenge Regulation nötig ist, um eine RP4 tragende Zelle am Leben zu erhalten.

Die Mutanten, die von RP4-5-4 nicht complementierbar sind, könnten in erster Näherung als solche definiert werden, die nicht Replikations-defekt sind, sondern Defekte in der Regulation der kill-Genregion aufweisen. Dieser Aussage liegt die Vermutung zugrunde, daß RP4-5-4 zwar alle Replikationsgene besitzt, aber nicht mehr die potentiell letale RP4-Funktion.

In Kapitel E.IV.3. soll versucht werden, diese genetischen Aspekte mit den bisher bekannten Kartierungsdaten zu korrelieren.

IV. Kartierungen essentieller RP4-Gene

Die bereits in der Einleitung besprochene Kartierung von Replikationsgenen auf RP4 soll auch als Grundlage der abschließenden Diskussion eigener Kartierungsergebnisse dienen.

Die im weiteren verwendeten Skizzen enthalten aus Gründen der besseren Übersicht nur die gerade zur Diskussion stehenden Markierungen. Anhand der immer

oben eingezeichneten EcoRI-Schnittstelle (E) können sie mit der gesamten RP4-Karte verglichen werden. (Zum Vergleich stehen neben der Zeichnung in der Einleitung auch die Abb. 2, 13 und 28 zur Verfügung)

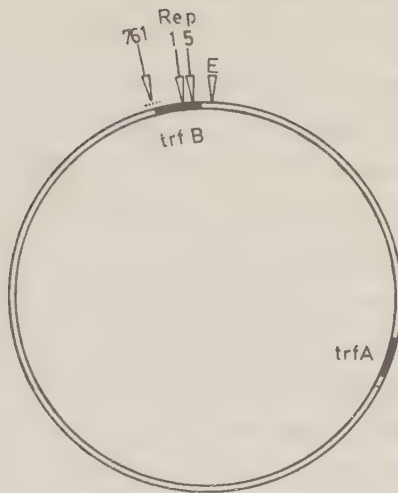
Eine exakte Korrelation verschiedener Kartierungsdaten aus der Literatur mit den eigenen Ergebnissen war vor allem im Bereich der EcoRI-Stelle nicht möglich. Diese Stelle wurde zwar definitionsgemäß als Punkt 0 gewählt, in den Plasmid-Längen Angaben bestehen jedoch noch Unstimmigkeiten. Neben dem in der Arbeit verwendeten Wert 57,4 kb (46) findet man die Angaben 54 kb (10), 55 kb (81) und 56,4 kb (82) als Meßwerte für RP4 bzw. RK2.

IV.1. Die Replikationsfunktion trfB

Mit trfB (transacting replication function B) wurde eine RP4-Region bezeichnet, die links neben der EcoRI-Schnittstelle auf den beiden HaeII-Fragmenten B₁ und B₂ liegt (19).

Die Mu-Insertionen der RP4-2 Mutanten Rep1 und Rep5 liegen genau in diesem Bereich (vgl. Abb. 28), markieren also mindestens ein RP4-spezifisches Replikationsgen. Die essentielle HaeII-Fragmente B₁ und B₂ umfassen einen Bereich von 2 kb, der etwa 0,4 kb links neben EcoRI beginnt (19). Die Mu-Insertionen in Rep1 und Rep5 wurden demnach im rechten Abschnitt dieser Region lokalisiert.

Die nachfolgende Skizze faßt diese Ergebnisse zusammen.



Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang eine RP4-Mutante, die durch Insertion des Transposons Tn76 erzeugt wurde (83). Diese Mutante, pRP761, erwies sich als sehr instabil. (83).

Aufgrund der nicht vorhandenen Übereinstimmungen in den Längenangaben konnte der Insertionsort (761 ↓) in der Skizze nicht genau angegeben werden. Er liegt entweder am linken Ende oder knapp außerhalb der *trfB* Region.

Es sei weiterhin angemerkt, daß Rep1 und Rep5 die einzigen der 11 getesteten RP4-2 Mutanten sind, die von RP5-4-5 transcomplementiert werden.

IV.2. Die Replikationsfunktion trfA

Unterhalb der Tc-Resistenzdeterminante, etwa bei den RP4-Koordinaten 16-18,7 kb liegen die HaeII-Fragmente D und A, auf denen die Replikationsfunktion trfA lokalisiert wurde (19). Die Region trfA ist ein Teil des SmaI-Fragments 2. In diesem Fragment wurde bei keiner der 11 getesteten Mutanten Mu-Insertion gefunden (vgl. Kap. D.IV.1.).

Es könnte sich hierbei um ein statistisches Problem handeln, das durch die Konstruktion und Kartierung weiterer RP4-Rep::Mu Plasmide gelöst werden kann. Denkbar wäre allerdings auch, daß es biologisch nicht möglich ist, trfA zu mutieren und dann in einem homologen Transcomplementationssystem zu testen.

"Homologes System" ist hier so zu verstehen, daß RP4-trfA::Mu von einem anderen RP4 Derivat complementiert werden sollte, also einem Helfer-Plasmid, das unter der gleichen Replikations-und Inkompatibilitäts-Kontrolle steht wie das mutierte Testplasmid.

Es wäre zu prüfen, ob sich in einem heterologen Transcomplementationsexperiment, d.h. mit einer auf einem RP4-fremden Replikon klonierten trfA-Region, RP4-trfA::Mu Mutanten leichter isolieren lassen.

Es ist bisher nicht gelungen, widerspruchsfreie Modellmechanismen zu diesem Punkt zu entwickeln.

Es kann nach den vorliegenden Messungen auch nicht ganz ausgeschlossen werden, daß trfA auf pSR100 etwas kürzer ist als im Wildtyp RP4, und damit nicht genügend aktiv, um trfA-Transcomplementation zu erlauben.

IV.3. Die potentiell letale (kill-) Funktion des RP4-Plasmids

Es wurde bereits erwähnt (E.III.2.4. und III.3.3.), daß RP4 eine für die Wirtszelle letale Funktion besitzt, die nicht essentiell für die RP4-Replikation selbst ist (20).

Die transcomplementationsabhängigen Mutationen in Rep3 und Rep4 liegen weder in trfA noch in trfB, sie könnten demnach etwas mit dieser kill-Funktion zu tun haben.

Als einfachste Modellvorstellung hierzu bietet sich an, daß von den Mutanten Rep3 und Rep4 kein funktionsfähiger Repressor mehr synthetisiert wird.

Die Mu-Insertion in Rep3 wurde innerhalb, die in Rep4 knapp außerhalb des Transposons Tn1 kartiert (Abb.28). Diese Ergebnisse lassen sich am leichtesten damit erklären, daß es in Tn1 einen Promotor gibt, der auch die Transcription der angrenzenden RP4-Sequenzen steuert. Durch den polaren Effekt der Mu-Insertion wäre diese Transcriptionseinheit zerstört, der fehlende oder defekte kill-Repressor müßte durch Transcomplementation zur Verfügung stehen, damit die betreffenden Zellen überleben.

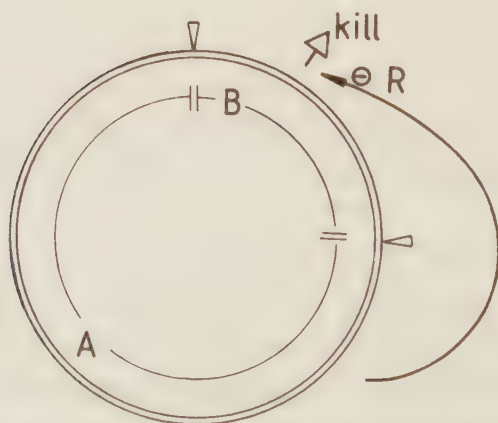
Die Existenz eines Tn1-eigenen Promotors, von dem aus Transcription über Tn1 hinaus erfolgt, wird auch in anderem Zusammenhang bestätigt (84; 85).

Wenn der Promotor des bla-Gens (Ap-Resistenz) für die Kontrolle der Transcription des kill-Repressors verantwortlich ist, könnte man auch sehr leicht erklären, warum in Mutageneseexperimenten mit Tn7 (8) oder Mu (31) nur extrem selten Ap-sensitive RP4 Mutanten gefunden

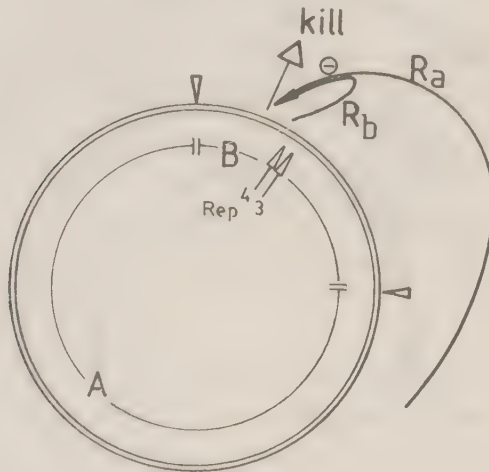
werden konnten; da beide Insertionselemente polar wirken, würden sie nach Integration im bla-Gen auch die Synthese des kill-Repressors verhindern.

Die Annahme eines einzigen kill-Repressors muß allerdings als zu starke Vereinfachung der Situation gewertet werden, wenn man weitere bekannte Tatsachen über dieses Phänomen berücksichtigt.

Die kill-Region wurde in einer Arbeit postuliert, die zeigte, daß ein RP4-Fragment B nicht ohne die Anwesenheit eines Fragments A kloniert werden kann und daß Zellen, die zunächst beide Fragmente enthalten, nach Verdrängung von Teil A nicht mehr lebensfähig sind. Daraus wurde der Schluß gezogen, daß irgendwo auf Fragment A ein Repressor codiert wird, der die letale Funktion auf B unterdrückt (20) :



Die Mutationen in Rep3 und Rep4 liegen nach dieser Einteilung aber selbst im Fragment B der RP4-Karte. Die Theorie, daß der kill-Repressor aus zwei Funktionseinheiten besteht, wäre allerdings wieder mit den bisher diskutierten Kartierungsdaten vereinbar, wie die nächste Skizze zeigt :



Zum Abschluß soll versucht werden, alle bisher verfügbaren Ergebnisse aus Transcomplementationsstudien und Kartierungsexperimenten sowie die daraus abgeleiteten Theorien in einem Schema darzustellen. (Abb. 30). In den Karten wurden die ISR1-Insertionen nicht berücksichtigt (vgl. Abb. 13 und 28). Es ist außerdem zu fordern, daß ISR1 und die kleine Deletion im RP4-2 Plasmid keinen Einfluß auf die in Tn1 startende Transcription der in Richtung der EcoRI-Stelle angrenzenden RP4-Sequenzen hat.

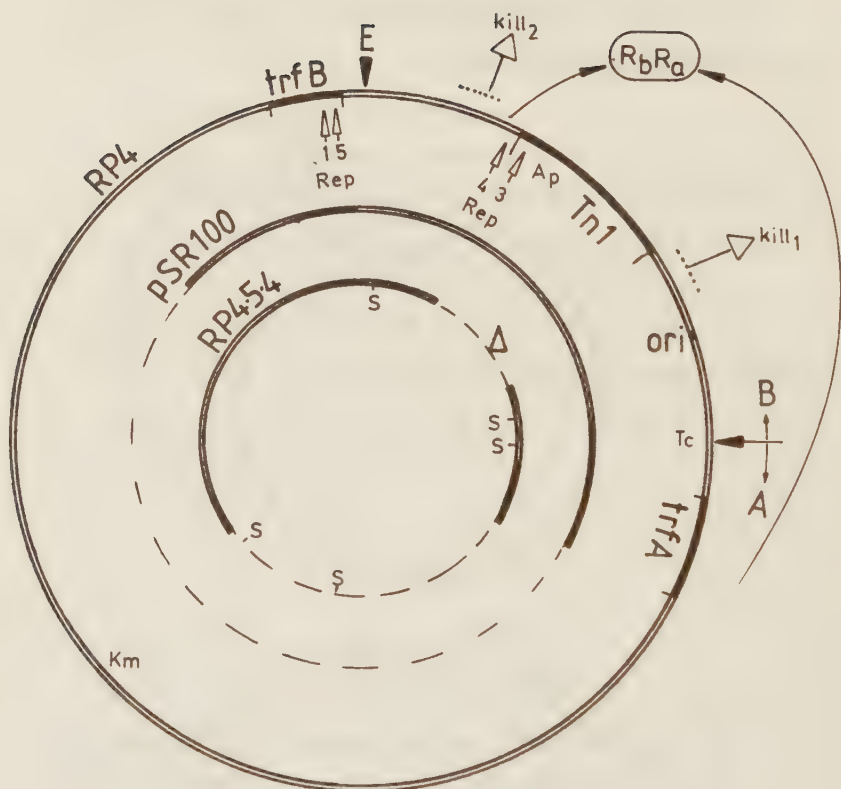


Abb. 30 : Zusammenfassende Darstellung der Kartierungsergebnisse und deren Interpretationen
(E: EcoRI-; S: SmaI-Schnittstelle)

Im äußeren Kreis (RP4) sind mit A und B die RP4-Fragmente bezeichnet, die durch Teilung des Moleküls an den mit ∇ gekennzeichneten Stellen entstehen.

Die kill-Funktion liegt irgendwo auf B, entweder unterhalb oder oberhalb von Tn1 (die möglichen Positionen sind mit kill₁ und kill₂ angedeutet); sie wird von dem oben postulierten komplexen Repressor R_aR_b kontrolliert, dessen Untereinheiten von verschiedenen Regionen des RP4-Plasmides stammen.

Der mittlere Kreis stellt pSR100 dar, der alle in der Arbeit isolierten Rep-Mutanten complementiert.

Der innere Kreis zeigt RP4-5-4. Mit Δ (Deletion) sind die RP4-Sequenzen bezeichnet, die RP4-5-4 im Vergleich zu pSR100 weniger hat.

RP4-5-4 kann die Mutationen der RP4-2 Plasmide Rep3 und Rep4 nicht complementieren, obwohl er die entsprechende DNA-Region hat.

Ein Vergleich mit pSR100 legt die Vermutung nahe, daß die mit Δ markierte deletierte Region eine Rolle in den bisher nicht genau zu definierenden Wechselwirkungen der RP4-Funktionen spielen, die den für die Zellen tödlichen Effekt bewirken bzw. diese Funktionen regulieren. Es wäre z.B. möglich, daß auf RP4-5-4 der Teil R_b des kill-Repressors aufgrund der großen Deletion in Tn1 nicht mehr exprimiert wird. Damit wäre erklärt, warum Rep3 und Rep4 nicht complementiert werden.

Die kill-Funktion auf RP4-5-4 dürfte dann aber selbst nicht wirksam sein, womit die mit "kill₁" angegebene Position für das letale Gen als wahrscheinlich anzunehmen ist.

Die Existenz von mehreren kill-Funktionen und entsprechend komplexen Regulationsmechanismen kann nach dem jetzigen Kenntnisstand nicht ausgeschlossen werden.

Es ist weiterhin vollkommen unklar, warum RP4-5-4 nur die Mutanten Rep1 und Rep5 complementiert, nicht aber die übrigen, die (außer Rep3 und Rep4) nach den Restriktionsanalysen im Sma-Fragment 1 mutiert sind. Die Karte zeigt, daß diese Region in RP4-5-4 unverändert vorliegt.

V. Ausblick

Das abschließende Kapitel enthält eine Liste der Fragen, die in der vorliegenden Arbeit nicht beantwortet werden konnten bzw. die sich aus den hier gewonnenen Erkenntnissen neu ergaben.

Die Lösung dieser Probleme muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben. Dabei wird es nötig sein, die Analysen auf weitere P-Typ Plasmide auszudehnen (erste Ergebnisse in dieser Richtung liegen bereits vor;66). Außerdem sollten in Zukunft neben der hier entwickelten in-vivo Mutagenese Technik, den rein genetischen Testmethoden und den Heteroduplexexperimenten noch weitere experimentelle Verfahren eingesetzt werden, wie z.B. Klonierung und Funktionstest einzelner P-Typ Plasmid-Fragmente oder Proteinanalysen von RP4-codierten Genprodukten.

1) Läßt sich das im Replikon-Modell postulierte, für RP4-Replikation essentielle Membranprotein nachweisen ? (Entsprechende Methoden könnten aus publizierten Arbeiten über Chromosom-Membran-Bindungsproteine übernommen werden)

2) Worauf beruht die asymmetrische Inkompatibilität zwischen P-Typ-Plasmid Derivaten wie RP4 und pSR100 ?

2a) Hat pSR100 eine schwächere Affinität zum Membranprotein oder weniger Erkennungssequenzen ?

2b) Gibt es zwischen P-Typ Plasmiden mehr Inkompatibilitätsmechanismen als nur die Konkurrenz um einen essentiellen Membranplatz ?

3) Warum wachsen Zellen, die RP4 und pSR100 vermehren (müssen), langsam und mit ungewöhnlicher Zellmorphologie ?

3a) Gibt es in Zellfilamenten mehrere Chromosomen und mehr als einen RP4-spezifischen Membranbindungsplatz ?

3b) Gibt es spezifische Wechselwirkungen zwischen RP4- und chromosomaler Replikation, deren Störung zur Bildung der Zellfilamente führt.

3c) Im Stamm S143 existiert ein Transcomplementations-system (Rep1+pSR1213) das normales Zellwachstum erlaubt. Ein einfaches Heteroduplexexperiment würde zeigen, welche RP4-Region dem pSR120-Derivat pSR1213 fehlt. Damit ließe sich der Teil des RP4-Moleküls näher definieren, der für die Zellteilungsstörungen in den zwei-Plasmid-Zellen verantwortlich ist.

4) Sind die Replikationsfunktionen verschiedener P-Typ Plasmide homolog ?

Hierzu sind Transcomplementationsexperimente zwischen RP4-Rep⁻ Mutanten und klonierten R751-Fragmenten (66) geplant.

5) Wie sehen die Genprodukte von Replikationsregionen aus ? RP4- oder R751-Plasmid-Fragmente, die nach Klonierung in einem multicopy-Vektor zur Transcomplementation von RP4-Rep⁻ Mutanten fähig sind, sollten in einem Minizell-System analysiert werden. Falls mehr als ein Replikationsprotein gefunden werden können, besteht die Möglichkeit, die entsprechende Operonstruktur durch Tn5-Mutagenese aufzuklären (86).

6) Gibt es die kill-Funktion auch auf anderen P-Typ Plasmiden und sind die dazugehörigen Regulationsmechanismen homolog ?

(Es gibt Hinweise, daß sich einige Fragmente von R751 nicht klonieren lassen (66). Analoge Beobachtungen haben zur Entdeckung des kill-Phänomens bei RP4 geführt.)

7) Hat die kill-Funktion etwas mit RP4-spezifischen Incompatibilitätsreaktionen zu tun ? Die Untersuchungen an RP4-ColE1 Derivaten legen diesen Schluß zunächst nahe; es wurde nämlich gezeigt, daß Deletionen im Bereich der kill-Region (Fragment B in Abb.30) Incompatibilitätsreaktionen abschwächen oder ganz eliminieren können (81). Allerdings haben die Inc⁻ Mutanten sehr große Deletionen und sind gleichzeitig auch Rep⁻, sie lassen also noch keine definitive Antwort auf die oben gestellte Frage zu.

8) Warum segregieren aus den Zellfilamenten der Stämme mit Rep⁻ Plasmiden keine plasmidfreien Zellen ?

Bei den vermutlich kill-Repressor-defekten Mutanten Rep3 und Rep4 war zu erwarten, daß nach Eliminierung des Helferplasmides pSR100 die Zellen nicht länger lebensfähig sind. Aber warum tritt dieser Effekt auch bei den in trfB mutierten Plasmiden Rep1 und Rep5 auf ? Ist die Replikationsregulation zwischen RP4 und Chromosom irgendwie gekoppelt oder bewirkt allein eine außer Kontrolle geratene RP4-Replikation eine für die Zelle letale Situation ?

Nach einem Überblick über alle verfügbaren Ergebnisse und den daraus resultierenden neuen Fragen muß das Zusammenspiel von RP4-spezifischen Stabilitäts-, Replikations- und Inkompatibilitätsfunktionen und den dazugehörigen Regulationsmechanismen noch als weitgehend unverstanden eingestuft werden.

Es kann auch nicht ganz ausgeschlossen werden, daß es einen direkten oder zumindest indirekten Einfluß von RP4-Funktionen auf den Wirtsmetabolismus gibt und daß auf solchen hypothetischen Wechselwirkungen vielleicht auch die Fähigkeit des RP4 Plasmides beruht, in allen getesteten gram-negativen Bakterien zu replizieren.

F. ANHANGF.I. Liste der verwendeten Abkürzungen

Ap	Ampicillin
BPB	Bromphenolblau
ccc	"covalently closed circular" Plasmid DNA
cfu	"colony forming units"
Col ⁱ	Colicin-immun
CsCl	Cäsiumchlorid
CSH	Cold Spring Harbour
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EcoRI	Restriktionsendonuclease EcoRI
E.coli	Escherichia coli
EtBr	Ethidiumbromid
F' ⁺ lac	Fertilitätsplasmid F mit integriertem lac-Operon
HaeII	Restriktionsendonuclease HaeII
Hfr	"high frequency of recombination" : im Chromo- som integriertes Fertilitätsplasmid
Inc	Inkompatibilität
kb	Kilobasen
Km	Kanamycin
log	logarithmisch
min	Minuten
m.o.i.	"multiplicity of infection"
Mu ^r	Mu-resistent
Mu _c ⁺	Wildtyp-Mu-Phage
Mu _{cts}	hitzeinduzierbarer Mu-Phage
Nc	Natriumcitrat
Nx	Nalidixinsäure
oc	"open circular" Plasmid DNA
PA	Penassay
pg	Picogramm
r	resistent
Rec	Rekombination
Rep	Replikation
Rf	Rifampicin
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute = Umdrehungen/min

RT	Raumtemperatur
s	sensitiv
sec	Sekunden
Sm	Streptomycin
SmaI	Restriktionsendonuclease SmaI
Std	Stunden
Tc	Tetracyclin
Tn	Transposon
Tp	Trimethoprim
Tra	Transfergen(e)

F.II. Literaturverzeichnis

- 1) N. Datta et al.
Properties of an R factor from *Pseudomonas aeruginosa*
J. Bact. 108, 1244 (1971)
- 2) N. Datta, R.W. Hedges
Host ranges of R factors
J. Gen. Microbiol. 70, 453 (1972)
- 3) R.H. Olsen, P. Shipley
Host range and properties of the *Pseudomonas*
R factor R1822
J. Bact. 113, 772 (1973)
- 4) J.G. Beringer
R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*
J. Gen. Microbiol. 84, 188 (1974)
- 5) H.J. Brukardt, G. Rieß, A. Pühler
Relationship of group P1 plasmids revealed by hetero-
duplex experiments: RP1, RP4, R68 and RK2 are identical
J. Gen. Microbiol. 114, 341 (1979)
- 6) V.A. Stanisich, P.M. Bennet
Isolation and characterization of deletion mutants in-
volving the transfer genes of P group plasmids in
Pseudomonas aeruginosa
Molec. Gen. Genet. 149, 211 (1976)
- 7) J. Grinsted, P.M. Bennet, M.H. Richmond
A restriction map of R-plasmid RP1
Plasmid 1, 34 (1977)
- 8) P.T. Barth, N.J. Grinter
Map of plasmid RP4 derived by insertion of transposon C
J. Molec. Biol. 113, 455 (1977)
- 9) A. Depicker, M. Van Montagu, J. Schell
Physical map of RP4
in "DNA insertion elements, plasmids and episomes"
(ed. Bukhari, Shapiro, Adya; Cold Spring Harbour
Laboratory, 1977) S.678

- 10) P.T. Barth, N.J. Grinter, D.E. Bradley
Conjugal transfer system of plasmid RP4 :
analysis by transposon 7 insertion
J. Bact. 113, 43 (1978)
- 11) B.W. Holloway
Plasmids that mobilize bacterial chromosome
plasmid 2, 1 (1979)
- 12) D. Figurski, R. Meyer, D.S. Miller, D.R. Helinski
Generation in-vitro of deletions in the broad host
range plasmid RK2 using phage Mu insertions and
restriction endonucleases
Gene 1, 107 (1976)
- 13) R. Meyer, D. Figurski, D.R. Helinski
Restriction enzyme map of RK2
in (wie 9) S.680
- 14) P.T. Barth, N.J. Grinter
A Tn7 insertion map of RP4
in (wie 9) S.675
- 15) R. Meyer, D. Figurski, D.R. Helinski
Properties of the plasmid RK2 as a cloning vehicle
in (wie 9) S.559
- 16) R.W. Hedges, J.M. Cresswell, A.E. Jacob
A non-transmissible variant of RP4 suitable as
cloning vehicle for genetic engineering
FEBS Letters, 61, 186 (1976)
- 17) H. Haque
Transformation of Pseudomonas aeruginosa and Escherichia
coli with resistance plasmid DNA : formation of smaller
conjugative plasmids from RP1
Molec. Gen. Genet. 171; 107 (1979)
- 18) R.J. Meyer, D.R. Helinski
Unidirectional replication of the P-group plasmid RK2
Biochim. Biophys. Acta 478, 109 (1977)

- 19) C.M. Thomas, R. Meyer, D.R. Helinski
Regions of broad-host-range plasmid RK2 which
are essential for replication and maintenance
J. Bact. 141, 213 (1980)
- 20) D.H. Figurski, D.R. Helinski
Replication of an origin-containing derivative of plas-
mid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 1648 (1979)
- 21) C.M. Thomas, D. Stalker, D. Guiney, D.R. Helinski
Essential regions for the replication and conjugal
transfer of the broad host range plasmid RK2
in " Plasmids of medical, enviromental and commercial
importance" (ed. K.N. Timmis, A. Pühler; Elsevier,
North-Holland; 1979) S.375
- 22) A.E. Jacob, N.J. Grinter
Plasmid RP4 as a vector replicon in genetic engineering
Nature 255, 504 (1975)
- 23) A.L. Taylor
Bacteriophage-induced mutations in Escherichia coli
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 50, 1043 (1963)
- 24) J. Martuscelli et al.
Electron microscopic evidence for linear insertion
of bacteriophage Mu-1 in lysogenic bacteria
J. Virol. 8, 551 (1971)
- 25) W. Boram, J. Abelson
Bacteriophage Mu integration : on the mechnism
of Mu-induced mutations
J. Molec. Biol. 62, 171 (1971)
- 26) A. Bukhari, D. Zipser
Random insertion of Mu-1 DNA within a single gene
Nature New Biology 236, 240 (1972)
- 27) E.R. Daniell, R. Roberts, J. Abelson
Mutations in the lac operon caused by bacteriophage Mu
J. Molec. Biol. 69, 1 (1972)

- 28) J. Denarie et al.
Potential of RP4::Mu plasmids for in vivo genetic engineering of gram negative bacteria in (wie 9) S.507
- 29) M. Faelen et al.
In vivo genetic engineering : the Mu-mediated transposition of chromosomal DNA segments onto transmissible plasmids in (wie 9) S.521
- 30) A. Campbell et al.
Nomenclature of transposable elements in prokaryotes in (wie 9) S.15
- 31) R. Simon
Mu-induzierte Mutanten des RP4-Plasmids
Diplomarbeit, 1978, Erlangen
- 32) S. Cooper, C.E. Helmstetter
Chromosome replication and the division cycle of *Escherichia coli* B/r
J. Mol. Biol. 31, 519 (1968)
- 33) J.B. Hansen, R.H. Olsen
Isolation of large bacterial plasmids and characterization of the P2 incompatibility group plasmids pMG1 and pMG5
J. Bact. 135, 227 (1978)
- 34) J. Tomizawa et al.
Replication of Colicin E1 plasmid DNA in cell extracts. Origin and direction of replication
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71, 2260 (1974)
- 35) P. Spitzbarth
Molekulare Charakterisierung von Insertionsmutanten des RP4-Plasmids
Dissertation, Erlangen (1978)
- 36) R. Simon, A. Pühler, H.J. Burkardt
Eine durch Mu-Phagen induzierte Deletion des RP4-Plasmids in *E.coli*
Hoppe-Seylers Z. Physiol Chem. 358, 308 (1977)

- 37) R. Simon (1978) unveröffentlicht
- 38) R.P. Novick
Uniform nomenclature of bacterial plasmids: a proposal
Bact. Rev. 40, 168 (1976)
- 39) R.W. Hedges, A. Jacob
Transposition of ampicillin resistance from
RP4 to other replicons
Molec. Gen. Genet. 132, 31 (1974)
- 40) A. Pühler
Das Verhalten des Resistenzfaktors RP4 aus *Pseudomonas*
aeruginosa in dem Bodenbakterium *Rhizobium lupini* und
dem Enterobakterium *Escherichia coli*
Habilitation, Erlangen (1976)
- 41) U. Priefer
Dissertation, in Vorbereitung
- 42) J.H. Miller
Experiments in molecular genetics
Cold Spring Harbour Laboratory (1972)
- 43) R.S. Jobanputra, N. Datta
Trimethoprim R factors in Enterobacteria from
clinical specimens
J. Med. Microbiol. 7, 169 (1974)
- 44) R. Kahmann, D. Kamp, D. Zipser
Mapping of restriction sites in Mu DNA
in (wie 9) S.335
- 45) N. Kleckner, R.K. Chan, B.-K. Tye, D. Botstein
Mutagenesis by insertion of a drug-resistance
element carrying an inverted repetition
J. Molec. Biol. 97, 561 (1975)
- 46) H.J. Burkhardt, R. Mattes, A. Pühler, W. Heumann
Electron microscopy and computerized evaluation of
some partially denatured group P resistance plasmids
J. Gen. Microbiol. 105, 51 (1978)

- 47) F. Heffron, C. Rubens, S. Falkow
Transposition of a plasmid deoxyribonucleic acid
sequence that mediates ampicillin resistance:
identity of laboratory-constructed plasmids
and clinical isolates
J. Bact. 129, 530 (1977)
- 48) N. Datta, R.W. Hedges
Compatibility groups among $\text{fi}^{\text{--}}\text{R}$ factors
Nature 234, 222 (1971)
- 49) R.C. Clowes
Molecular structure of bacterial plasmids
Bacteriol. Rev. 36, 361 (1972)
- 50) R.P. Novick et al.
Uniform nomenclature for bacterial plasmids: a proposal
Bacteriol. Rev. 40, 168 (1976)
- 51) F. Jacob, S. Brenner, F. Cuzin
On the regulation of DNA replication in bacteria
Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. 28, 329 (1964)
- 52) R.H. Pritchard, P.T. Barth, J. Collins
Control of DNA synthesis in bacteria
Symp. Soc. Gen. Microbiol. 19, 263 (1969)
- 53) R. Maas
Exclusion of an F-lac episome by an Hfr gene
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 50, 1051 (1963)
- 54) E. Dubnau, W.K. Maas
Inhibition of replication of an F'lac episome in
Hfr cells of Escherichia coli
J. Bact. 95, 531 (1968)
- 55) K. Ishii, T. Hashimoto-Gotoh, K. Matsubara
Random replication and random assortment model
for plasmid incompatibility in bacteria
Plasmid 1, 435 (1978)
- 56) R.P. Novick, M. Schwesinger
Independence of plasmid incompatibility and repli-
cation control functions in Staphylococcus aureus
Nature 262, 623 (1976)

- 57) R.P. Novick, F.C. Hoppensteadt
On plasmid incompatibility
Plasmid 1, 421 (1978)
- 58) F. Cabello, K. Timmis, S.N. Cohen
Replication control in a composite plasmid constructed
by in vitro linkage of two distinct replicons
Nature 259, 285 (1976)
- 59) T Saitoh, S. Hiriga
F deoxyribonucleic acid superinfected into pheno-
copies of donor strains
J. Bact. 121, 1007 (1975)
- 60) B.E. Uhlin, K. Nordström
Plasmid incompatibility and control of replication :
copy mutants of the R factor R1 in Eschericia coli K12
J. Bact. 124, 641 (1975)
- 61) S. Molin, K. Nordström
Control of plasmid R1 replication :
functions involved in replication, copy number control,
incompatibility and switch-off of replication
J. Bact. 141, 111 (1980)
- 62) D. Figurski et al.
Replication regions of plasmid ColE1, F, R6K and RK2
Microbiology 1978, 105 (1978)
- 63) J.J. Manis, B.C. Kline
F incompatibility and copy number genes : their map
locations and interactions
Plasmid 1, 492 (1978)
- 64) K.N. Timmis, I. Andres, P.M. Slocombe
Plasmid incompatibility : cloning analysis of an
incF_{II} determinant of R6-5
Nature 273, 27 (1978)
- 65) K.N. Timmis et al.
Plasmid-encoded functions involved in the replication
and inheritance of antibiotic-resistance plasmid R6-5
Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. 43, 105 (1979)

- 66) W. Gräff
Diplomarbeit in Vorbereitung
- 67) T. Hashimoto-Gotoh, J. Inselburg
ColE1 plasmid incompatibility : localization
and analysis of mutations affecting incompatibility
J. Bact. 139, 608 (1979)
- 68) G. Warren, D. Sherrat
Complementation of transfer deficient ColE1 mutants
Molec. Gen. Genet. 151, 197 (1977)
- 69) J.R. Bedbrook, F.M. Ausubel
Recombination between plasmids leading to the
formation of plasmid multimers
Cell 9, 707 (1976)
- 70) J.R. Bedbrook, H. Lehrach, F.M. Ausubel
Directive segregation is the basis of ColE1
plasmid incompatibility
Nature 281, 447 (1979)
- 71) E. Hinchliffe, A. Vivian
Naturally occurring plasmids in Acinetobacter calco-
aceticus: a p class R factor of restricted host range
J. Gen. Microbil. 116, 75 (1980)
- 72) J.N. Coetzee et al.
Properties of R plasmid R722 and the corresponding
pilus-specific phage pR722
J. Gen. Microbil. 110, 263 (1979)
- 73) W.D. Donachie et al.
Role of the ftsA gene product in control of
Escherichia coli cell division
J. Bact. 140, 388 (1979)
- 74) M. Masters
Strains of Escherichia coli diploid for the
chromosomal origin of DNA replication
Molec. Gen. Genet. 143, 105 (1975)

- 75) W. Gräf, R. Simon, A. Pühler
Untersuchungen zur Replikation des Hybridplasmides
"miniRP4:ColE1" unter dem Einfluß von Chloramphenicol
Großpraktikumsarbeit, Erlangen, (1978)
- 76) D.H. Figurski, R.J. Meyer, D.R. Helinski
Suppression of ColE1 replication properties by the
IncP-1 plasmid RK2 in hybrid plasmids constructed
in vitro
J. Mol. Biol. 133, 295 (1979)
- 77) P.A. Meacock, S.N. Cohen
Genetic analysis of the inter-relationship between
plasmid replication and incompatibility
Molec. Gen. Genet. 174, 135 (1979)
- 78) A. Toussaint, M. Faelen, A.I. Bukhari
Mu-mediated illegitimate recombination as an
integral part of the Mu life cycle
in (wie 9) S.275
- 79) A. Arthur, D. Sherratt
Dissection of the transposition process : a trans-
poson-encoded site-specific recombination system
Molec. Gen. Genet. 175, 267 (1979)
- 80) A.I. Bukhari
Reversal of mutator phage Mu integration
J. Mol. Biol. 96, 87 (1975)
- 81) V.A. Sakanyan et al.
Mapping of RP4 plasmid using deletion mutants of
pAS8 hybrid (RP4-ColE1)
- 82) R. Meyer, D. Figurski, D.R. Helinski
Physical and genetic studies with restriction endo-
nucleases on the broad host-range plasmid RK2
Molec. Gen. Genet. 152, 129 (1977)
- 83) T.T. Barth
RP4 and R300B as wide host-range plasmid cloning
vehicles
in (wie 21) S.399

- 84) C. Rubens, F. Heffron, S. Falkow
Transposition of a plasmid deoxyribonucleic acid
sequence that mediates ampicillin resistance :
independence from host rec functions and orientation
of insertion
J. Bact. 128, 425 (1976)
- 85) K.L. Calame et al.
Promotor sites on plasmid NTP1 which contains the
ampicillin resistance transposon Tn1701
J. Mol. Biol. 127, 397 (1979)
- 86) W. Klipp
persönliche Mitteilung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Mikrobiologie und Biochemie der Universität Erlangen durchgeführt.

Das legendär gute "Betriebsklima" an Prof. W. Heumann's Institut hat Wesentliches zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. A. Pühler, dessen fachliche und moralische Unterstützung mir über viele Schwierigkeiten hinweghalf.

Die geduldige Hilfsbereitschaft, mit der mich Dr. H.J. Burkardt bei der Bändigung launenhafter Geräte (z.B. Philips EM400) unterstützte, verdient gesonderte Erwähnung.

Äußerst hilfreich für mich waren nicht zuletzt die endlosen Diskussionen, zu denen sich A. Pühler's Mitarbeiter Dr. F. Schöffl, W. Gräf, W. Klipp und U. Priefer zu jeder Tages- und Nachtzeit bereitfanden.

Lebenslauf

Name Reinhard Simon

Geburtstag 14.11.1949

Geburtsort Steinwiesen

Eltern Michael Simon, Elisabeth Simon geb. Weinrich

1956 - 1960 Volksschule

1960 - 1969 Humanistisches Gymnasium

Juni 1969 Reifeprüfung am Melanchthon Gymnasium Nürnberg

1969 - 1970 Grundwehrdienst

1970 - 1977 Studium an der Friedrich Alexander Universität
 Erlangen-Nürnberg

Okt. 1973 Vordiplom in Biologie

Feb. 1977 Diplom in Biologie

1976 - 1977 Diplomarbeit am Insitut für Mikrobiologie
 Thema: Mu-induzierte Mutanten des RP4-Plasmids

ab Feb. 1977 Promotion am Institut für Mikrobiologie in
 Erlangen

1977 - 1979 Stipendium der Studienstiftung des
 Deutschen Volkes

Copy-Center 2000

852 ERLANGEN · Obere Karlstr. 30
Tel. 09131-26197